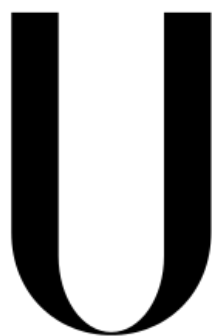


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Estudo das atividades biológicas medicinais do extrato aquoso
de *Vernonia condensata* “Boldo-Baiano”**

*(Inibição de acetilcolinesterase, atividade antioxidante, HMG-CoA redutase e
biodisponibilidade de colesterol)*

Ana Amélia Arantes Veloso de Carvalho

MESTRADO EM QUÍMICA
ESPECIALIZAÇÃO EM QUÍMICA

Lisboa
2014

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Estudo das atividades biológicas medicinais do extrato aquoso
de *Vernonia condensata* “Boldo-Baiano”**

*(Inibição de acetilcolinesterase, atividade antioxidante, HMG-CoA redutase e
biodisponibilidade de colesterol)*

Ana Amélia Arantes Veloso de Carvalho

MESTRADO EM QUÍMICA
ESPECIALIZAÇÃO EM QUÍMICA

Dissertação orientada pela Professora Doutora Maria Luísa Mourato de
Oliveira Marques Serralheiro

Lisboa
2014

**A mente que se abre a uma nova ideia
Jamais voltará ao seu tamanho original.
Albert Einstein**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por ser o que sou por ter chegado onde estou, me abençoando e iluminando meus passos e me dando forças nos momentos difíceis.

À minha família, em especial a minha mãe Mônica e minha avó Marta, pelo incondicional amor e incentivo, e por terem me educado e me preparado para a vida, me fortalecendo e ensinando com suas palavras, que iluminaram meus caminhos com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medo e cheia de esperanças a vocês o meu muito obrigado. A minha irmã Nathalia que sempre acreditou e esteve sempre ao meu lado. Ao Victor por estar ao lado da minha mãe e por acreditar nesse sonho.

Ao meu noivo, pelo apoio e amor, pelos momentos mais felizes e por me confortar e me fazer perseverar nos momentos difíceis.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro, agradeço todo o apoio, disponibilidade, confiança, boa disposição, e pelo apoio me orientando sempre ao longo de todo o trabalho. Ao Dr. Pedro Falé, pelos ensinamentos adquiridos durante esse trabalho, e pela identificação dos compostos no extracto. À Prof Dr^a Lia Ascensão do Departamento de Biologia da FCUL por ter sugerido o trabalho com a planta *Vernonia condensata*. À Dr^a Larissa Corrêa do Bomfim Costa, por ter fornecido a planta para realização desse trabalho e a todos envolvido nesse trabalho do Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus, Baia, Brasil.

A Dr^a. Maria da Conceição de Oliveira Ferreira ex-secretária do departamento DQB pelo apoio e a sua grande disponibilidade a me orientar e ajudar sempre que precisava e a Dr^a Isabel Cabral, técnica da Consciência Social, que através desse programa pode ter um apoio que foi essencial e conhecer essa pessoa maravilhosa que esta sempre pronta para me incentivar a ir em frente.

As minhas amigas Juliana Borges e Nara Nunes, mesmo longe me deram todo apoio. Aos colegas de laboratório do Departamento de Química e Bioquímica, em especial Francisca Arez por criar um ambiente de trabalho único, sempre com boa disposição e alegria. A Três colegas em especial Liliana Vieira, Filipa Teixeira e Zurema pelo apoio e amizade, pelas conversas jogadas fora, companhia e que me deram força para encarar até os momentos mais complicados sempre com alegria. Vou sentir saudades!

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, me ajudaram a concluir este projeto.

A todos vós o meu, Muito Obrigada.

Resumo

A maioria da população tende a fazer uso de produtos de origem natural, especialmente a utilização de plantas como alternativa de medicação. O extrato *Vernonia condensata*, conhecido vulgarmente como Boldo-Baiano, pertence a família Asteracea. É uma planta muito utilizada no Brasil, indicada para tratar distúrbios gastrointestinais e reduzir o colesterol no sangue, assim a sua caracterização permitirá a compreensão das suas potencialidades como agente terapêutico.

O estudo do efeito do extrato aquoso foi iniciado com a preparação do extracto desta planta em forma de infusão e decocção («chás») sendo analisado posteriormente a fim de explicar as atividades biológicas, como a atividade inibitória acetilcolinesterase, inibição da HMG-CoA redutase e a atividade antioxidante.

Analizou-se a composição química do extrato por HPLC-DAD e LC-MS, o que permitiu concluir que os principais compostos presentes nesta planta são o ácido clorogénico e cinarina. Seguidamente, o estudo das atividades biológicas do extracto aquoso foi realizado, apresentando um valor de atividade inibitória do enzima acetilcolinesterase de IC_{50} decocção de $411 \pm 20 \mu\text{g/ml}$ e atividade antioxidante de EC_{50} decocção de $20 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$.

Foi ainda estudado o metabolismo *in vitro* por ação do suco gástrico usando pepsina a pH1 e suco pancreático usando pancreatina a pH8, simulando assim a digestão gastrointestinal. Os resultados obtidos permitiram concluir que durante o processo de digestão os compostos foram mantidos, não sendo registadas alterações na sua composição química e nem nas suas atividades (atividades antioxidante e inibitória de acetilcolinesterase).

As linhas celulares Caco-2 e HepG-2 foram usadas para testar a toxicidade do extrato aquoso, utilizando o teste MTT. Obteve-se um valor de IC_{50} decocção de $0,59 \pm 0,006 \text{ mg / ml}$ para as Caco-2 e um valor de IC_{50} decocção de $0,58 \pm 0,01 \text{ mg/ml}$ para as HepG-2, verificando que o extrato dessa planta não é tóxico para estas células.

Em relação à permeabilidade dos compostos do extrato aquoso, verificou-se que o ácido clorogénico permeia, *in vitro*, a barreira intestinal em maior quantidade do que a cinarina e a decocção de *V. condensata* foi capaz de reduzir a permeabilidade do colesterol numa quantidade semelhante à do fármaco, nas concentrações utilizadas.

Palavras-chave: *Vernonia condensata*, atividades biológica, citotoxicidade, colesterol, ácido clorogénico e cinarina.

Abstract

Most people tend to make use of natural products, especially the use of plants as an alternative to medication. The *Vernonia condensata* extract, commonly known as Bilberry-Baiano, belongs to Asteraceae. It is a plant widely used in Brazil, indicated to treat gastrointestinal disorders and reduce blood cholesterol, thus its characterization will allow the understanding of its potential as a therapeutic agent.

The study of the effect of aqueous extract was started with the preparation of the extract of this plant in the form of infusion and decoction ('teas') and subsequently analyzed in order to explain the biological activities such as acetylcholinesterase inhibitory activity, inhibition of HMG-CoA and antioxidant activity.

We analyzed the chemical composition of the extract by HPLC-DAD and LC-MS, which showed that the major compounds present in this plant are chlorogenic acid and cynarin.

Subsequently, the study of the biological activities of the aqueous extract was performed, showing a value of inhibitory activity of the enzyme acetylcholinesterase decoction IC_{50} of 411 ± 20 $\mu\text{g/ml}$ and antioxidant activity EC_{50} decoction of 20 ± 0.6 mg/mL . Metabolism has also been studied *in vitro* by the action of gastric juices pH1 using pepsin and pancreatic juice using pancreatin pH8, simulating gastrointestinal digestion. The results showed that during the process of digestion the compounds were kept, not being tracked changes in its chemical composition nor in its activities (antioxidant activity and inhibition of acetylcholinesterase).

The cell lines Caco-2 and HepG-2 were used to test the toxicity of the aqueous extract using MTT assay. This gave an IC_{50} value of 0.59 ± 0.006 mg/ml to Caco-2 and an IC_{50} value decoction 0.58 ± 0.01 mg/ml for the HepG-2, verifying that the extract of this plant do not is toxic to these cells.

Regarding the permeability of the compounds of the aqueous extract, it was found that the permeate clorogénio acid *in vitro* the intestinal barrier in greater quantity than cynarin and *V. condensata* decoction was able to reduce the permeability of cholesterol in a similar amount the drug at the concentrations used.

Keywords: *Vernonia condensata*, biological activities, cytotoxicity, cholesterol, chlorogenic acid and cinarina.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	v
Índice.....	vii
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	xi
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xiii
Capítulo I – Introdução e Objetivos.....	1
1.1. Plantas Utilizada como Medicinais.....	3
1.1.1. Importância das plantas medicinais.....	3
1.1.2. <i>Vernonia condensata</i> - Família Asteracea.....	5
1.1.3. Boldos.....	6
1.2. Doenças do Sistema Colinérgico.....	8
1.2.1. Alzheimer.....	8
1.2.2. Motilidade gastrointestinal.....	9
1.2.2.1. Enzimas e sistema Digestivo.....	11
1.2.2.2. Digestão.....	12
1.2.3. Atividade Inibitória de Acetilcolinesterase.....	13
1.3. Doenças Cardiovasculares.....	15
1.3.1. Colesterol: biossíntese e inibição.....	16
1.3.2. HMG-CoA redutase e estatinas.....	17
1.4. Stress Oxidativo e Atividade Antioxidante.....	19
1.5. Objectivos.....	21
Capítulo II – Materiais e Métodos.....	23
2.1. Materiais.....	25
2.1.1. Material Vegetal.....	25
2.1.2. Reagentes.....	25
2.1.3. Linhas celulares.....	26
2.1.4. Equipamento.....	26
2.2. Métodos.....	27
2.2.1. Preparação dos Extractos Aquosos.....	27
2.2.2. Determinação de Actividades Biológicas.....	28
2.2.2.1. Determinação da Actividade Antioxidante.....	28
2.2.2.2. Inibição da Actividade da Acetilcolinesterase.....	29

2.2.2.3 Inibição da Actividade da HMG-CoA redutase.....	30
2.2.3. Análise dos extractos por HPLC-DAD.....	31
2.2.4. Identificação dos Compostos Maioritários do extracto aquoso de <i>V. condensata</i> por Espectrometria de Massa (MS)	32
2.2.5. Ensaio de Metabolismo <i>in vitro</i> do Extracto Aquoso de <i>V. condensata</i>	33
2.2.5.1. Digestão por Suco Gástrico Artificial.....	33
2.2.5.2. Digestão por Suco Pancreático Artificial.....	33
2.2.6. Ensaio em células Caco-2 e Hep-G2.....	34
2.2.7. Estudo da Permeação da Barreira Intestinal e permeação dos Compostos do extracto aquoso de <i>Vernonia condensata</i>	36
Capítulo III – Resultados e Discussão.....	39
3.1. Composição do Extracto Aquoso de <i>Vernonia condensata</i>	41
3.1.1. Identificação dos constituintes maioritários do extracto aquoso.....	41
3.1.2. Análise do extracto aquoso por Espectrometria de Massa (MA).....	46
3.2. Actividade Antioxidante e Actividade Inibitória de Acetilcolinesterase.....	47
3.2.1. Actividade antioxidante.....	48
3.2.2. Actividade Inibitoria de Acetilcolinesterase.....	50
3.3 Determinação da Citotoxicidade do extrato Aquoso de <i>V. condensata</i>	54
3.4. Metabolismo <i>in vitro</i> do extracto aquoso de <i>V. condensata</i>	55
3.4.1. Digestão do Extracto Aquoso pelo Suco Gástrico Artificial.....	56
3.4.2 Digestão do Extracto Aquoso pelo Suco Pancreático Artificial.....	57
3.5. Inibição da actividade da HMG-CoA pelo extracto aquoso <i>V. condensata</i>	62
3.6. Estudo da permeação do colesterol com extracto aquoso <i>V. condensata</i>	64
3.7. Permeação do extracto aquoso <i>V. condensata</i> nas células Caco-2.....	66
Capítulo IV – Conclusão e Perspectivas Futuras.....	69
1. Conclusão.....	71
2. Perspectivas Futuras.....	73
Capítulo V – Bibliografia.....	75

Índice de Figuras

Figura 1. (A) Boldo-Baiano (<i>Vernónia condensata</i>) e (B) Boldo-do-chile (<i>Peumus boldos</i>). Fonte retirada: www.asplantasmedicinais.com	7
Figura 2. Esquema resumido. Caminho percorrido do alimento até sua fase final - eliminação. Fonte: Adaptado de Gião et al 2012.....	10
Figura 3. Síntese acetilcolina. Fonte: adaptada de: <i>The neuromuscular junction</i> ; www.frca.co.uk/article.aspx?articleid=228	14
Figura 4. Uma versão reduzida é mostrado aqui, o que evidência as estruturas químicas do material de partida (HMG-CoA) e produto (melovato) desta etapa. Fonte: Adaptada Istvan & Deisenhofer et al 2001.....	18
Figura 5. Estrutura tridimensional de vários inibidores de estatina. Modo de ligação de compactina (A), sinvastatina (B), a fluvastatina (C), cerivastatina (D), a atorvastatina (E), e rosuvastatina (F).As interações entre as metades da HMG das estatinas e da proteína Fonte:Adaptada Istvan & Deisenhofer et al 2001.....	19
Figura 6 . Esquema representativo da extinção do DPPH na presença de uma amostra com capacidade de captação do radical.Fonte : Adaptada Molyneux et al. ,2004.....	28
Figura 7. Esquema reaccional que ilustra a reação da AChE com acetiltiocolina, resultado final, no produto corado, TNB. Fonte : Adaptado de Frasco et al., 2013.....	29
Figura 8. Representação esquemática da reação enzimática HMG-CoA redutase.Fonte: http://sobregorduras.blogspot.com/2011/05/colesterol.html	31
Figura 9. Esquema reacional da redução do MTT. Fonte: Stepnowski, P., Skladanowski, A.C., Ludwiczak, Laczynska, E. (2004).....	35
Figura 10. Estruturas químicas dos principais compostos detectados nos extractos aquosos de <i>V. condensata</i> . Fonte: http://www.wikipedia.org	41
Figura 11. Perfis cromatográficos obtido por HPLC para os extractos aquosos de <i>V. condensata</i> decocção e infusão.....	42
Figura 12. Espectros de absorção UV-Visível obtidos por HPLC-DAD para os sete picos maioritários do extracto aquoso de <i>V. condensata</i> (1mg/mL): P1 (Tr = 7,5 min), P2 (Tr = 8,6 min), P3 (Tr = 12,4 min), P4 (Tr = 12,9 min),P5 (Tr = 13,4 min), P6 (Tr = 14,0 min), P7 (Tr = 14,5 min).....	45
Figura 13. Espectro de massa MS do composto com Tr =8,6 min, obtido em modo negativo, com varrimentos entre os 150 e os 600 Da.....	46
Figura 14. Espectro de massa MS2 do composto com Tr =13,6 min, obtido em modo negativo, com varrimentos entre os 150 e os 600 Da.....	47

Figura 15. Percentagem de extinção do radical livre DPPH, reflexo da actividade antioxidante, em função de concentração crescente de extracto aquoso de <i>V. condensata</i>	48
Figura 16. Representação gráfica da inibição da actividade do enzima acetilcolinesterase (%) em função da concentração do extracto aquoso de <i>V. condensata</i> preparado por decocção. Ensaio realizado em triplicado.....	51
Figura 17. Cromatograma do extracto <i>V. condensata</i> obtido por HPLC após digestão com suco gástrico.....	56
Figura 18. Cromatograma do extracto aquoso de <i>V. condensata</i> decocção obtido por HPLC após digestão com suco pancreático artificial.....	58
Figura 19. Sedimentado no tubo de Eppendorf após 4 horas de incubação do extracto <i>V. Condensata</i> com o suco pancreático.....	60
Figura 20. Cromatograma da confirmação do sedimentado retido no fundo do tubo de Eppendorf obtido por HPLC (T= 4 horas de digestão pancreática artificial).....	60

Índice de Tabelas

Tabela 1. Gradiente utilizado para o método analítico no HPLC	31
Tabela 2. Grandiente utilizado para as corridas de HPLC analítico.....	32
Tabela 3. Grandiente utilizado para as corridas de HPLC analítico.....	32
Tabela 4. Identificação dos compostos do extracto aquoso de <i>Vernonia condensata</i> decoção por espectrometria de massa.....	43
Tabela 5. Atividade antioxidante (EC) determinada pelo método DPPH. Valores de EC ₅₀ expressos em µg/mL.....	49
Tabela 6. Actividades inibitória do enzima acetilcolinesterase (AChE). Valores encontrados de IC ₅₀ para diferentes extractos aquosos.....	53
Tabela 7. Ensaio de citotoxicidade em células HEP-G2 e Caco-2 com seus respectivos valores de IC ₅₀	55
Tabela 8. Actividade antioxidante e actividade inibitória de AChE do <i>V.condensata</i> após digestão com suco gástrico artificial.....	57
Tabela 9. Actividade antioxidante e actividade inibitória AChE do <i>V.condensata</i> após digestão com suco pancreático.....	59
Tabela 10. Actividade inibitória de AChE do extracto aquoso <i>V.condensata</i> após digestão com suco pancreático.....	61
Tabela 11. Valores de IC ₅₀ para a inibição de HMG-CoA redutase.....	63
Tabela 12. Biodisponibilidade do colesterol na presença do extracto <i>V. condensata</i>	65
Tabela 13. Biodisponibilidade dos principais compostos do extracto aquoso <i>V. Condensata</i> através de monocamadas Caco-2.....	67

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abs	Absorvência
ACh	Acetilcolina (do inglês <i>Acetylcholine</i>)
AChE	Acetilcolinesterase (do inglês <i>Acetylcholinesterase</i>)
BHA	Butil-hidroxianisol (do inglês <i>Butylated hydroxyanisole</i>)
BHI	Do ingles <i>Brain Heart Infusion</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado (do inglês <i>Butylated hydroxytoluene</i>)
Ch	Colina (do inglês <i>Choline</i>)
CoA	Coenzima A
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido (do inglês <i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil (do inglês 2,2- <i>diphenylpicrylhydrazyl</i>)
DTNB	5,5'-Ditiobis [2-ácido nitrobenzóico] (do inglês 5,5'- <i>dithiobis [2-nitrobenzoic acid]</i>).
EC ₅₀	Concentração efectiva (do inglês <i>Effective concentration</i>) correspondente a 50% de extinção do radical
FBS	Soro fetal bovino (do inglês <i>Fetum bovine serum</i>)
HBSS	Do ingles <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Ácido clorídrico (do inglês <i>Hydrochloric acid</i>)
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinoetanossulfónico (do inglês 4-(2- <i>hydroxyethyl</i>)1-piperazineethanesulfonic acid)
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta resolução (do inglês <i>High Precision Liquid Chromatography-Diod Array Detector</i>).
IC ₅₀	Concentração inibitória (do inglês <i>Inhibitory concentration</i>) correspondente a 50% de inibição.
m/z	Razão massa/carga do ião
MgCl ₂ .6H ₂ O	Cloreto de magnésio hexahidratado
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-1-il]-2,5-difenil-tetrazólio (do inglês 3-(4,5 <i>Dimethylthiazol-2-yl</i>)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).
NADH	do inglês Nicotinamida-adenina dinucleotídeo
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio

PBS	Tampão de sais de fosfatos (do inglês <i>Phosphates buffer solution</i>)
Pen-Strep	Penicilina e estreptomicina (do inglês <i>Penycilin and streptomycin</i>)
ROS	Espécies reactivas de oxigénio (do inglês <i>Reactive oxxygen species</i>)
FDA	(do inglês <i>Food Drug Admistration</i>)
TFA	Ácido trifluoracético (do inglês <i>Trifluoroacetic acid</i>)
tr	Tempo de retenção
UA	Unidades de absorvência

Capítulo I – Introdução e Objetivos

1.1.Plantas Utilizada como Medicinais

1.1.1. Importância das plantas medicinais

As plantas medicinais tem sido utilizada desde de tempos remotos pelo homem, onde em tumbas com cerca de 60.000 anos foram encontradas as primeiras evidências de sua utilização (Lietava et al., 1992). Naquela época o seu uso era o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos, sendo a descoberta da sua utilização de modo totalmente empírico ou intuitivo, baseado em descobertas ao acaso. Com o passar dos tempos essas descobertas encontradas, como a utilização e o seu potencial carácter curativo, foi sendo acumulado e transferido para suas gerações, o que tornou sua utilização importante entre eles. Esta atividade simboliza uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (Júnior et al., 2005).

O conhecimento sobre o valor terapêutico das plantas, transmitido oralmente ou por escrita durante séculos, é hoje a base das diferentes farmacopéias. As plantas hoje constituem a principal forma de resposta às necessidades de cuidados da saúde nos países menos desenvolvidos, dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que cerca de 65% da população mundial, baseia-se a sua utilização ainda no conhecimento tradicional, sendo 30% desse total sem nenhuma indicação médica.

Muitas plantas que são utilizadas para diversos tratamentos de doenças, não possui nenhum suporte científico para a atividade que lhes é atribuída , sendo essas plantas muitas vezes utilizada como uma alternativa de medicação. O interesse de investigação nesta área tem-se verificado um aumento, por se achar que este tipo de tratamento é menos invasivo e propício a efeitos adversos, quando comparado com os tradicionais fármacos. Nem sempre esse interesse foi assim, nos anos 70 nenhuma das grandes empresas farmacêuticas mundiais mantinha interesse nessa linha (Valentão et al., 2002).

Vários são os fatores que têm contribuído para um aumento nas pesquisas, como a comprovada eficácia de substâncias originadas de espécies vegetais, como por exemplo a utilização do jaborandi, com atividade antiglaucoma considerado indispensável para o tratamento ou mesmo um clássicos, como é o caso da *Papaver somniferum* L (Papaverácea), vulgarmente conhecida por papoula, planta usada para a extração do ópio, cujo componente majoritário é a morfina - isolada por Setürner, princípio ativo empregado para combater a dor desde 1803-04 e por muitas plantas serem matéria-prima para a síntese de fármacos. (Silva & Carvalho 2004.; Hostettmann,Queiroz & Vieira, 2003).

As plantas utilizadas como medicinais têm sido utilizadas tradicionalmente para o tratamento de várias enfermidades, pois além de seu uso na medicina popular ao longo dos tempos com finalidades terapêuticas, têm contribuído para obtenção de vários fármacos. O uso das plantas além dos já citados como tratamento de várias doenças, vai além, pois a população insere o uso de vegetação em suas atividades diárias: como no trabalho (amarrar lenha e vassouras); alimentação (condimentos); lazer (reunião de amigos para o chá da cinco); higiene (fabricação de sabonete) e descanso (travesseiros).

A forma de utilização hoje mais conhecida na medicina natural é o “chá”, sendo uma bebida processada de espécies vegetais por meio de infusão, ou seja, através da submersão de plantas secas em água a ferver e teve a sua primeira produção na China, há cerca de 5000 anos, sendo desde aí considerado um produto terapêutico para muitas doenças e infeções (Chan et al., 2010; Moraes et al., 2011).

Foi difundido pelo mundo, tendo sido introduzido na Europa no século XVII (Petisca et al., 2008) e atualmente, entre os vários alimentos funcionais, é uma bebida amplamente consumida no mundo (por cerca de dois terços da população mundial, com um consumo mundial per capita de 120 mL/dia), a seguir à água (Henning et al., 2003 ; Lamarão & Fialho, 2009).

O elevado consumo do “chá” prende-se não só pelo seu aroma atrativo e gosto singular mas também pelo interesse nas suas propriedades potencialmente promotoras de saúde, visto que diversos estudos epidemiológicos relacionam o seu consumo com uma redução do risco de doenças (cardiovasculares, diabetes, níveis de colesterol elevados, osteoporose), entre outros benefícios. A ingestão dessa bebida (“chá”) deverá ocorrer numa dieta fraccionada (várias vezes ao dia), para que possa proporcionar um efeito benéfico, devendo ser consumido entre refeições, para não interferir na biodisponibilidade de nutrientes provenientes da ingestão alimentar (Lamarão & Fialho, 2009).

Desta forma, considera-se este um fator de grande incentivo ao estudo com plantas, visando sua utilização como fonte de recursos terapêuticos, pois o reino vegetal representa, em virtude da pouca quantidade de espécies estudadas, um vasto celeiro de moléculas a serem descobertas. Podemos destacar também o alto custo dos medicamentos industrializados, onde muitos buscam a alternativa nas plantas, sendo muitas vezes cultivadas na própria casa (Lamarão & Fialho, 2009). Apesar de muitas plantas usadas como alternativas para tratamentos de doenças como câncer, aterosclerose, hipertensão dentre outras, pesquisas científicas deve ser feitas sobre atividade farmacológica das plantas bem como os efeitos tóxicos (Singi et al., 2005).

1.1.2. *Vernonia condensata* - Família Asteracea

Vernonia condensata, pertencente à família Asteracea, é popularmente conhecida como “boldo-baiano”, é uma das mais cultivadas em jardins e hortas no Brasil. A sua origem é africana, tendo sido trazida com os escravizados desde a época colonial. Essa planta é recomendada no Brasil para distúrbios gastrointestinais (GID) e para reduzir os níveis de colesterol no sangue (Pizziolo et al 2011).

A família Asteracea é uma das maiores famílias de Angiospermas, com cerca de 24.000-30.000 espécies incluídas em 1.600-1.700 gêneros, tem uma distribuição cosmopolita, correndo em quase todos os continentes, exceto na Antártida, sendo esta utilizada há séculos em Medicina tradicional (Funk et al., 2005; Gott et al., 2010).

Nos últimos 25 anos, esta família vem sendo intensamente estudada não somente quanto à sua morfologia, anatomia, citogenética, ecologia mas também como sua estrutura macromolecular (Holmes et al., 1996). Com estes diversos estudos pretende-se ter um maior conhecimento sobre a classificação em Asterácea.

Cerca de 120 espécies deste gênero foram estudadas quimicamente e de modo geral, os compostos que mais se destacam são os flavonóides e os terpenóides (Verdi et al., 2005). São ricas em estruturas secretoras e apresentam uma grande variedade de atividades biológicas e farmacológicas que lhes conferem um estatuto importante no que se refere à procura de compostos bioativos (Moreira, et al, 2003; Davies et al., 2004). A presença de estruturas secretoras é responsável pela síntese de uma grande variedade de compostos que estão envolvidos na defesa química dessas plantas.

As plantas que constituem a família asteraceas podem assumir quase todas as formas de vida: ervas, lianas, epífitas, apresentando raramente porte arbustivo ou arbóreo conseguindo chegar a todos os meios ambiente, isso pode justificar o sucesso adaptativo dessa família e refletido no seu elevado número de espécies e ampla distribuição geográfica (Adedeji & Jewoola, 2008; Funk et al., 2005). Quanto ao seu habitat, as asteraceas são encontradas em diversos lugares: beira de estrada, na mata, campo pastado, campo com afloramento rochoso, mata ciliar e sobre rochas.

Estudos já comprovaram que plantas com alto teor de flavonoides são utilizadas na prevenção e tratamento de hiperlipemia, hipercolesterolemia e aterosclerose (IV Diretrizes da SBC, 2007).

Porém, o uso desses vegetais e as formulações devem ser utilizadas com cautela. Vê-se assim que o estudo de plantas medicinais, em especial dos seus extratos aquosos, em variados aspectos, é fundamental para que a sua aplicação como fitoterapêuticos possa proporcionar à população um tratamento para diversas enfermidades, e para que possam ser utilizados com segurança.

1.1.3. Boldos

Apesar do pouco conhecimento científico sobre plantas medicinais, foi a elas que várias culturas, durante séculos, recorreram, para o tratamento, cura e prevenção das suas doenças. A denominação “boldo” no início do século só era referência ao boldo-do-chile e na Primeira Farmacopéia Brasileira no ano 1929 há somente citação deste com nome científico – *Boldus boldus* - que atualmente não é mais utilizado, exceto em algumas farmácias (Pizziolo et al 2011).

O Brasil possui uma grande biodiversidade de plantas, mas o boldo é conhecido em toda a parte, apresentando uma grande tradição no seu uso, sendo suas folhas comumente tomadas, após refeições, sob a forma de “chás” de ervas devido às potenciais propriedades curativas conhecida a tempos.

Os “chás” bebidas preparadas a partir de infusões e/ou decocções de plantas, têm vindo a demonstrar propriedades antioxidantes e um elevado poder inibitório de AchE, entre outras, que poderão ajudar a explicar a sua ação benéfica.

No caso das enzimas poder-se-á referir a enzima acetilcolinesterase que tem sido alvo de inúmeros estudos numa tentativa de encontrar e explicar o comportamento de alguns “chás” sobre doenças neurodegenerativas como a AD e ação digestiva. Tendo em conta que esta patologia afecta cada vez mais a população, é de extrema importância continuar a investigação de plantas utilizadas na medicina tradicional.

Algumas plantas são chamadas de boldos, por isso o boldo-baiano apresenta alguns nomes que são conhecidos em diferentes regiões e também são confundidos com algumas plantas já conhecidas como por exemplo: figatil, Boldo-do-chile, e alcachofra (Pizziolo et al 2011). As denominações deste boldo, como pode-se observar, variam muito entre si, apesar de muitos dos nomes já indicarem a sua utilização. Curioso também é o uso dos nomes alcachofra e boldo-do-chile, pois nos aspectos visuais não há semelhança com o boldo-baiano (figura 1).

Essa ampla variação de nomes se dá principalmente pela importância que a medicina popular dá a esta planta. De qualquer maneira todos os boldos são usados pela população para problemas hepáticos.

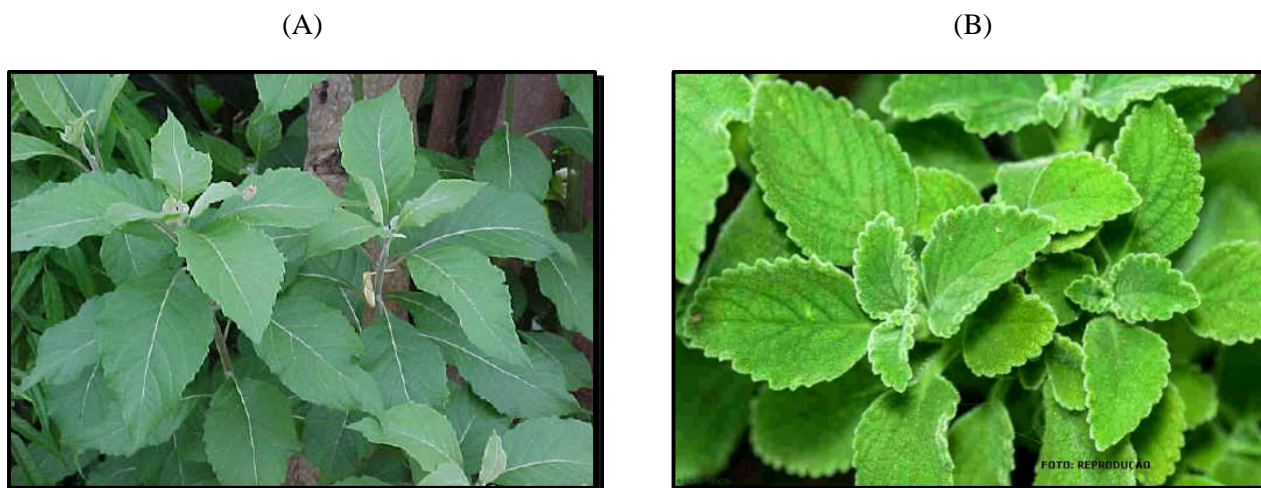


Figura 1 –(A) Boldo-Baiano(*Vernonia condensata*) e (B) Boldo-do-chile(*Peumus boldus*)

Fonte : www.asplantasmedicinais.com

O interesse pelo estudo fitoquímico do boldo-baiano foi estimulado pelo amplo uso popular das suas folhas para o tratamento de problemas digestivos em substituição das substâncias químicas. O boldo-baiano contém diferentes tipos de compostos, entre os quais flavonoides e ácidos fenólicos, responsáveis por importantes atividades biológicas, tais como a atividade antioxidante, antimicrobiana e inibitória de enzimas.

No grupo de investigação onde este trabalho foi desenvolvido, foram feitos vários estudos com extratos aquosos, um desses trabalhos foi com os extractos de *P. Barbatus* e *P. boldus*, espécies de boldos diferentes, que evidenciaram que suas atividades antioxidante e atividades inibitória da AChE, podem deste modo contribuir para explicar a sua ação protetora a nível neurológico e digestivo (Falé et al.; 2010).

O *Plectranthus barbatus* (“falso boldo”), pertencente à família Lamiácea, e o *Peumus boldus* (boldo-do-chile), pertencente à família Monimiácea, são duas espécies de plantas extensamente utilizadas sob a forma de “chá”.

O *P. barbatus* é pouco consumido em Portugal, no entanto tem largo consumo em países como o Brasil, sendo suas propriedades curativas a nível do sistema digestivo e a nível de distúrbios no sistema nervoso (Lukhoba et al., 2006).

O *Peumus. boldus* é recomendado em Portugal com a finalidade de diminuir o nível de colesterol sanguíneo, é referido como uma planta medicinal na farmacopéia (Porfirio et al.,

2010). Na medicina popular, *P. boldus* é indicado para o tratamento de diversas infecções a nível do sistema digestivo e hepatobiliar (Doll et al.; 2005). Para além do seu papel como protetor hepático e estimulante digestivo, *P. boldus* é também tradicionalmente utilizado como agente anti-inflamatório, antiespasmódico e sedativo nervoso (Doll et al.; 2005).

Uma vez que estas plantas são conhecidas seria interessante conhecer o comportamento de outra espécie de boldo, como o boldo-baiano que pertence a outra família (Asteracea) diferentes dos outros boldos já estudados.

1.2. Doenças do Sistema Colinérgico

1.2.1. Alzheimer

A doença de Alzheimer (AD) é uma desordem neurodegenerativa progressiva que provoca a demência, a causa mais comum na população envelhecida e, de acordo com a OMS, afecta actualmente 18 milhões de pessoas. As estimativas apontam para que a maior percentagem de pessoas afectadas se encontre nos países desenvolvidos, devido ao aumento de esperança média de vida e ao conseguinte envelhecimento da população.

Esta patologia (AD) afeta cerca de 1,5% da população em idade entre 65-69 anos, 21% entre 85-86 e 39% acima dos 90 anos. Neurologicamente, todo este processo resulta em perda da função neuronal e dano sináptico, com subsequente comprometimento da memória, desequilíbrio emocional, à medida que a doença progride se torna mais severa podendo levar à falta da coordenação motora e do raciocínio, além de perda da capacidade cognitiva e demência (Cervellati et al; 2002; Ferreira & Abreu; 2007). A AD é caracterizada pela perda de neurónios e redução no tamanho dos lobos cerebrais frontais e temporais, regiões que estão envolvidas nos processos de aprendizagem e memória. Observa-se nos neurónios uma acumulação progressiva de filamentos helicóidais emparelhados (PHF, do inglês *paired helical filaments*), como os entrançamentos neurofibrilares (NFT, do inglês *neurofibrillary tangles*), assim como de fibras amilóides em placas neuríticas ou senis (SP, do inglês *senile plaques*), que estão também presentes nas paredes dos vasos sanguíneos (Chauchan & Chauchan, 2006). A principal proteína amilóide relacionada com a AD é a β -amilóide (A β), resultante da proteólise da proteína precursora amilóide, uma proteína transmembranar.

As abordagens terapêuticas para a AD têm sido baseadas nas suas características morfo-anatómicas e bioquímicas. Tem-se procurado desenvolver agentes que contrariem o

hipofuncionamento do sistema colinérgico, interferiram no metabolismo da A β , protejam os neurónios de metabolitos tóxicos formados no processo neurodegenerativo e intervenham no processo de formação de NFT (entrançamentos neurofibrilares) nos neurónios. Para além disso, têm-se procurado agentes antiinflamatórios que previnam a resposta negativa dos neurónios ao processo patológico (Bachurin et al 2002).

Em Medicina tradicional, várias espécies vegetais têm sido utilizadas para o tratamento de desordens cognitivas, incluindo a doença de Alzheimer (Mukherjee, Kumar, Mal & Houghton, 2007). Propriedades como a actividade anti-inflamatória, antioxidante e inibitória do enzima acetilcolinesterase têm vindo a ser estudadas, em extractos de plantas, para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para esta doença (Howes, Perry & Houghton, 2003). Na última década tem havido um particular interesse no estudo de plantas e especiarias incluídas na dieta humana, ricas em compostos fenólicos e conhecidas pelas suas propriedades antioxidantes (Calabrese et al., 2003).

1.2.2. Motilidade gastrointestinal

Patologias gastrintestinais custam cerca de 1/10 do dinheiro gasto na área de saúde, tendo assim uma elevada quantidade de medicamentos consumidos por problemas gastrintestinais. A utilização de medicamentos que aumentam a motilidade gastrointestinal são utilizados para vários sintomas, como por exemplo a dor abdominal recorrente associada a movimentos alterados do intestino (Ferreira & Abreu, 2007). A motilidade gastrointestinal define-se como o conjunto de movimentos responsáveis pela mistura e circulação dos conteúdos gastrintestinais, impulsionando-os ao longo de todo o tracto digestivo (Holzer & Maggi, 1994). Esses movimentos que são estimulados são importantes, pois são responsáveis pela circulação sanguínea, e para que ocorra sua digestão ao nível devido.

O enzima AChE encontra-se presente nas células epiteliais do intestino, onde a ACh é um dos principais neurotransmissores envolvidos no controlo dos movimentos peristálticos, nomeadamente na contracção ascendente (Jarvie et al., 2008). A ACh é um dos reguladores biológicos mais importantes do transporte iónico, controlando o movimento da água no intestino (Hirota & McKay, 2006). Assim, alterações no metabolismo colinérgico podem ter particular importância na função intestinal normal. No sistema nervoso entérico, inibidores de AChE previnem a degradação de ACh, aumentando a sua disponibilidade e, conseqüentemente, a motilidade gastrointestinal.

Esse movimento é impulsionado pela musculatura lisa e coordenado pelo sistema nervoso autônomo, por todo o tubo digestivo, iniciando-se no esôfago e terminando no reto. Todo trato gastrointestinal é composto por órgãos que realizam funções específicas para que o alimento seja quebrado em partículas menores e seus componentes, os nutrientes, sejam absorvidos pelo organismo. Esquema ilustrativo na Figura 2.

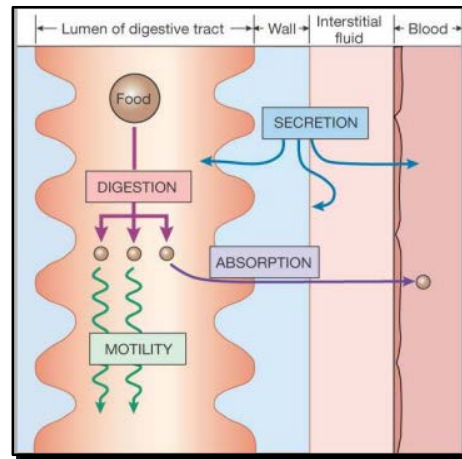


Figura 2. Esquema resumido. Caminho percorrido do alimento até sua fase final - eliminação. **Fonte :** Adaptado de Gião et al 2012.

Bolo alimentar é o nome dado ao alimento que foi mastigado juntamente com a saliva, ficando reduzido a uma pasta mole. É impulsionado até a faringe com a coordenação dos movimentos dos lábios, da língua e dos movimentos peristálticos, seguindo, posteriormente, para o esôfago e, finalmente, para o estômago, onde é digerido fisicamente e quimicamente: o estômago secreta ácido clorídrico, que dá início à transformação do bolo alimentar. Ao conteúdo resultante do estômago e do intestino delgado dá-se o nome de quimo (Hickman e al 2006;Gião et al 2012).

O peristaltismo é responsável pela progressão do conteúdo (bolo alimentar) ao longo da maior parte do tubo digestivo. As contrações musculares formam ondas peristálticas, compostas por uma onda de relaxamento dos músculos circulares que gera, por sua vez, uma onda de distensão que precede ao *bolus*; e, uma onda de contração muito forte dos músculos circulares que se sucede ao *bolus*, obrigando à sua progressão ao longo do tubo digestório (Gião et al 2012). Cada onda peristáltica percorre todo o esôfago em aproximadamente 10 segundos. No intestino delgado, as ondas peristálticas tem percursos curtos. Em alguns segmentos do intestino grosso, a progressão do conteúdo faz-se através dos movimentos de

massa, contrações que abrangem segmentos muito maiores do que os movimentos peristálticos (Hickman et al 2006;Gião et al 2012).

Atualmente são ainda escassos os estudos em ratos e humanos nomeadamente no contexto de formulação de modelos e tratamento de patologias gastrointestinais. No contexto de produtos naturais, várias espécies têm sido utilizadas empiricamente contra doenças gastrointestinais, e sua utilização encontra-se cada vez em expansão(Tajkarimi et al., 2010).

1.2.2.1. Enzimas e Sistema digestivo

No processo da digestão, ao longo do tracto gastrointestinal, a parte orgânica dos alimentos ingeridos fica exposta a diversos tratamentos físicos e químicos, a diferentes regiões ácidas e alcalinas e a sucos digestivos adicionados durante fases apropriadas à medida que o alimento passa através do tubo digestivo, sendo reduzidos em unidades mais elementares (em tamanho e complexidade), tornando-se mais solúveis e facilmente absorvidas pela mucosa intestinal (Hickman et al., 2006; Giori, 2010).

O tubo digestivo humano é constituído por boca, faringe, esófago, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), intestino grosso (ceco, cólon – ascendente, transversal, descendente e sigmóide), reto e ânus, estando-lhe associados a outros órgãos e glândulas secretoras que também participam na digestão (Giori et al., 2010).

As etapas iniciais onde o alimento vai passando é importante, pois prepara o alimento para digestão através da mastigação e insalivação, facilitando a acção enzimática. Dada a especificidade enzimática, existem enzimas próprias para a digestão de cada classe de compostos orgânicos, estando as suas células secretoras localizadas em regiões específicas do tubo digestivo, constituindo assim uma cadeia enzimática, onde uma enzima pode finalizar o que outra começou à medida que os produtos se movem no tracto digestivo (Hickman et al., 2006).

À medida que o alimento se transforma em bolo alimentar (alimento mastigado misturado com saliva) e vai sendo engolido para o esófago, a α -amilase continua a actuar, digerindo cerca de metade do amido antes de ser inativada pelo ambiente ácido estomacal, sendo o restante degradado no intestino (Hickman et al., 2006; Giori et al, 2010; Gião et al., 2012). Constituída pelo estômago, um tubo muscular em forma de “U” com glândulas produtoras de enzimas proteolíticas e de ácidos fortes, providencia a digestão inicial, misturando o bolo alimentar com os sucos digestivos produzidos pelo mesmo, após a sua entrada no estômago, através de movimentos segmentares (Hickman et al., 2006).

1.2.2.2. Digestão

Na literatura em 1994 encontra-se uma definição completa que define a digestão, como " o conjunto de processos físicos e químicos - químicos que quebram ou modificam os alimentos, transformando-os em pequenas moléculas de nutrientes tornando mais solúvel para serem absorvidas pelo intestino e transportados para os tecidos, provendo de energia todas as células do corpo. (Hickman et al., 2006; Giori et al, 2010).

Assim, de uma forma simples descrevemos que a digestão envolve: mistura e movimentos do alimento em torno do trato digestivo e quebra química de grandes moléculas de alimentos em pequenas moléculas de nutrientes (variam de acordo com o tipo de constituição e a graduação do alimento). Destaca-se a importância do fígado e pâncreas como órgãos participantes da digestão que secreta enzimas e auxiliam na digestão dos nutrientes. O Suco Gástrico, produzido no estômago, é um líquido claro que atua sobre as proteínas, transformando-as em polipeptídios, para que depois, no intestino delgado, esses polipeptídios sejam transformados em aminoácidos e sejam absorvidos.

A sua função é atuar na digestão gástrica dos alimentos, e principalmente das proteínas. O suco gástrico, secreta um volume de aproximadamente 2-3 L/dia, tem uma produção intermitente, que aumenta quando da estimulação por alimentos (visão e/ou cheiro), presença de alimento no estômago e/ou estados emocionais (ansiedade, raiva) (Hickman et al., 2006).

As glândulas gástricas são constituídas por diferentes tipos de células, cada uma secretam diferentes substâncias que vão constituir o suco gástrico: muco (constituído por água, sais e mucina, protege a mucosa estomacal de lesões mecânicas e químicas), enzimas (tais como o pepsinogênio que, em contato com o ácido clorídrico, é ativado como pepsina e tripsina (têm a função de degradar)), sais e ácido clorídrico (Hickman et al., 2006).

Este é o precursor da pepsina, uma protéase com especificidade preferencial para certas ligações peptídicas presente no suco e ajuda a destruir as bactérias presentes nos alimentos. Proporciona ainda o meio ácido ideal para a atuação das enzimas do suco, isto porque o seu pH varia entre o 1,5 e 2. O suco possui ainda lipase gástrica para digestão de gorduras (Lidon & Silvestre, 2010).

O suco pancreático e biliar, ambos com elevado ião bicarbonato, neutraliza o ácido gástrico e eleva o pH, mudança de pH é essencial, pois as enzimas intestinais atuam em ambientes neutros ou ligeiramente alcalinos. O suco pancreático, produto do pâncreas, cujo pH oscila entre 8,5 e 9, contém tripsinogênio e quimiotripsinogênio (precursores inativos)

que, sofrem acção enzimática, originando tripsina e quimiotripsina, e possui outras enzimas, como a carboxipeptidase, nucleases, lipase pancreática e amilase pancreática (Hickman et al., 2006; Lidon & Silvestre, 2010).

O fígado é responsável pela produção de bÍlis, cujo pH varia entre 8 e 8,5 (Lidon & Silvestre, 2010), e é constituída essencialmente por água, sais biliares e pigmentos, não possuindo enzimas de nenhum tipo. Entre refeições é armazenada na vesícula biliar que a lança quando estimulada pela presença de gorduras, percorrendo o ducto biliar até chegar ao duodeno, onde é secretada juntamente com o suco pancreático. Após a sua actuação, os sais biliares são absorvidos pelas células da parede do íleo, acumulados no fígado, conservados na vesícula biliar e novamente secretados no próximo ciclo de digestão.

Assim o processo da digestão no organismo é um fenómeno complexo que implica ingestão, hidrólise, absorção, secreção e trânsito, estudar e conhecer tal acontecimento é importante. Nos últimos anos, tem sido desenvolvido diversos métodos de digestão que permite estudar mudanças estruturais, digestibilidade alimentar e libertação de componentes alimentares sob condições simuladas, fornecendo assim informação precisa para diversos estudos.

1.2.3. Atividade Inibitória de Acetilcolinesterase

A acetilcolina (ACh) é uma molécula e existe nas fendas sinápticas e está envolvida na transmissão de sinal entre os neurónios, a sua associação com a doença de alzheimer(AD) foi descoberta por White *et al.* (1977), que ao examinar cérebros de pacientes com esta doença, descobriram uma deficiência em ACh. A ACh é sintetizada pela colina acetilcolinesterase a partir de colina (Ch) e acetil-CoA e transportada para vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de acetilcolina.

ACh é libertada por exocitose para a fenda sináptica e ativa os recetores de ACh muscarínicos e/ou nicotínicos localizados nas células pós-sinápticas (Palaia, Grozio, Cesario & Russo, 2008). Este neurotransmissor é inativado por uma reacção de hidrólise catalisada pelo enzima AChE, na fenda sináptica, de que resulta uma molécula de Ch e um grupo acetilo. Em doentes com AD, os níveis de acetilcolina estão bastantes diminuídos, o que indica uma actividade aumentada de AChE ou níveis diminuídos do neurotransmissor nas fendas sinápticas.

A Ch resultante é transportada de volta para o neurónio pré-sináptico por um transportador de alta afinidade para síntese de ACh adicionais. Todo o ciclo de transmissão

de sinal – ou seja, a liberação de ACh, a sua difusão através da fenda sináptica, a sua interação reversível com o recetor nicotínico e, finalmente, a sua hidrólise pela AChE – ocorre em alguns milissegundos. Portanto, todo o processo deve ser perfeitamente integrado, no espaço e no tempo (Paleari, Grozio, Cesario & Russo, 2008) Figura 3.

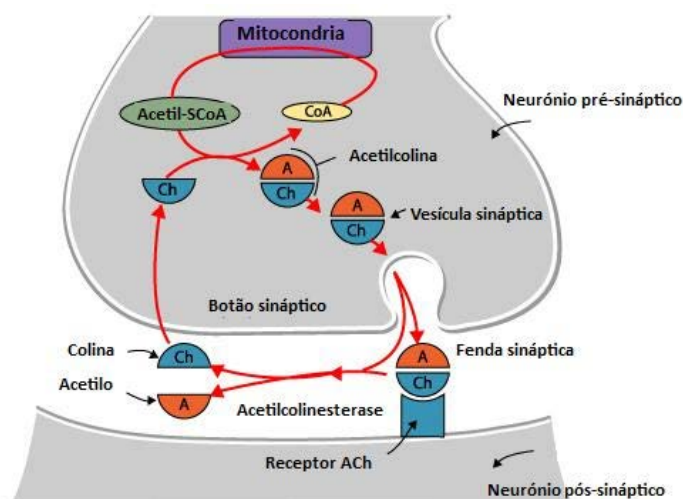


Figura 3 – Síntese acetilcolina. **Fonte** : Adaptada de *The neuromuscular junction*; (www.frca.co.uk/article.aspx?articleid=228).

Nos estudos encontrados na literatura os inibidores da AChE foram o primeiro grupo de fármacos aprovados para o tratamento sintomático da AD, atuando no sentido de restaurar o nível de acetilcolina no cérebro, consequentemente, prolongando a neuro transmissão colinérgica (Bachurin et al., 2003). Recentemente, têm sido exploradas abordagens terapêuticas envolvendo agonistas específicos de receptores muscarínicos (M_1) e nicotínicos ou antagonistas muscarínicos (M_2); mas os avanços obtidos na compreensão da evolução e das razões moleculares da gênese de DA têm demonstrado que o uso de inibidores de AChE deve ser a forma mais eficiente de controlo da evolução da doença.

A tacrina foi o primeiro fármaco sintético aprovado pelo FDA ("Food and Drug Administration") nos Estados Unidos para uso terapêutico, demonstrando efeito moderado, mas significativo no alívio dos sintomas de DA de intensidade, média e leve.

Entretanto, sua aplicação tem sido limitada devido aos sérios efeitos colaterais, como a hepatotoxicidade, que têm forçado os pacientes a descontinuarem o tratamento.

Além da tacrina, atualmente são conhecidos outros fármacos que estão sendo comercializados nos EUA e Europa: donepezil e a galantamina. Sendo estes, inibidores reversíveis da AChE, e que a galantamina é um produto natural, aprovado pelo FDA, que está

servindo de protótipo para desenvolvimento de novos fármacos anticolinesterásicos (Michaelis et al., 2003).

A diversidade de compostos tem dado uma esperança e possibilidade de explorar o estudo fitoquímico de várias espécies vegetais e de microorganismos, que possam fornecer novos modelos de substâncias anticolinesterásicas. Neste sentido, vários exemplares da biodiversidade têm sido estudados em decorrência de sua utilização popular. Um dos exemplos mais difundidos como fitomedicamentos são os extratos de Ginkgo (Gold et al 2002). Alguns estudos utilizando pacientes tratados com o extrato padronizado de *Ginkgo biloba* e com placebo revelaram que os efeitos foram comparáveis aos obtidos com o donepezil, que atualmente é um dos fármacos de escolha para o tratamento da DA. Aparentemente, muitos dos efeitos protetores estão associados ao uso crônico de extratos de Ginkgo e estão relacionados à presença de constituintes terpênicos e flavonoides, sendo esses com propriedades antioxidantes e antiinflamatórias (Gold et al., 2002).

1.3. Doenças Cardiovasculares

Em uma dieta à base de vegetais e frutas contém diversas substâncias com poder antioxidante e outras que contribuem para proteção e prevenção do desenvolvimento de diversas doenças. Sabe-se então que o uso de produtos da maioria naturais e uma alimentação equilibrada poder deter varias doenças. Recentemente, os produtos naturais têm sido apresentados como uma alternativa aos compostos químicos usados para prevenção da saúde e o seu uso pode dar origem a um menor número de efeitos secundários que os medicamentos químicos (Palombo et al, 2009).

O uso de partes de plantas como substituto de medicamentos para tratamentos de doenças, vem se destacando ultimamente. Umas das doenças que preocupa pelo aumento dos casos, são as doenças cardiovasculares. Dentre essas doenças, a aterosclerose se destaca, pois é caracterizada pelo depósito de colesterol nas artérias com formação de placas gordurosas que obstruem a passagem do sangue (Cotran et al., 2000).

1.3.1. Colesterol: biossíntese e inibição

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, em 2008 cerca de 39% de adultos apresentava níveis elevados de colesterol, sendo esse um fato para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Um dos fatores que contribuem para a aterosclerose é a alta concentração de lipídios no sangue (hiperlipidemia), caracterizada pelo aumento do colesterol (hipercolesterolemia) e dos triglicerídeos (hipertrigliceridemia). Sendo a aterosclerose uma doença multifatorial que avança sem sintomatologia aparente, a detecção de hiperlipidemia (hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia) e a prevenção podem estar ligadas à diminuição do risco da doença aterosclerótica (IV Diretrizes da SBC, 2007).

Para aterosclerose, diversas formas de intervenções, preventivas, curativas ou de redução têm sido utilizadas. Intervenções medicamentosas mostram efeitos positivos, porém o custo elevado e os efeitos colaterais de diversas drogas têm despertado interesse de investigadores em conhecer os efeitos de substâncias naturais na redução dos níveis de colesterol (Moll., et al 2006).

Ultimamente a busca de novos medicamentos para o tratamento da aterosclerose tem-se valorizado muito, como suplementos, alimentos alternativos e fitoterápicos que ajudem na redução de triglicerídeo e colesterol das lipoproteínas plasmáticas (Anila & Vijayalakshmi, 2002).

Produtos naturais derivados de plantas têm sido testados em animais e humanos com resultados positivos para os efeitos hipocolesterolêmicos (Kong et al., 2004). Flavonoides isolados ou purificados de plantas agem inibindo enzimas da biossíntese e absorção do colesterol, bem como enzimas lipogénicas (glicose 6-fosfato desidrogenase e enzima málica) e do metabolismo lipídico como lipoproteína lipase e a lecitina colesterol acil transferase (LCAT). Estas foram dosadas em fígado, tecido adiposo e plasma de ratos alimentados com dieta contendo colesterol (Anila & Vijayalakshmi, 2002; Jung et al., 2006).

Modelos *in vitro* de vários tipos de cultura celular têm sido utilizados por grandes laboratórios de pesquisas e indústrias farmacêuticas para comprovar, a nível molecular, o mecanismo de ação pelos quais os flavonoides são eficazes em reduzir a concentração de colesterol do sangue (Borradaile et al., 2002; Whitman et al., 2005; Brusq et al., 2006).

Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) é uma proteína transmembranar politópica que desempenha um papel crítico na absorção do colesterol.

O colesterol promove especificamente a internalização de NPC1L1 e que este processo requer microfilamentos e do complexo clathrin/AP2. O bloqueio de endocitose de NPC1L1 diminui drasticamente o colesterol internalizado, isso indica que NPC1L1 medeia a captação do colesterol através da endocitose vesicular. A redução de Hipercolesterolemia é levada a cabo por dois principais rotas, a inibição da absorção a nível intestinal, usando ezetimiba, que se liga ao transportador de colesterol proteína NPC1L1 ou inibição de a biossíntese de colesterol. (Garcia-Calvo et al., 2005)

A ezetimiba é um potente inibidor da absorção do colesterol que está sendo usado clinicamente para tratar hipercolesterolemia. (Davis & Veltri, 2004). Em alguns estudos encontrados na literatura a ezetimiba impede o NPC1L1 de entrar nas vesículas revestidas de clatrina Ap2, inibindo assim a endocitose de NPC1L1 e diminuindo a absorção de colesterol, tornando assim o fármaco mais utilizado para esse fim.

A maioria dos estudos farmacológicos foram feitos em modelos animais e tratam de efeitos antiaterogênico, redutor de gordura, anti-hipertensivo, efeito inibitório sobre a síntese de colesterol, propriedades vasodilatadoras e antioxidante. O mecanismo molecular de ação destes compostos é baseado na inibição da enzima chave da biossíntese do colesterol, a HMG-CoA redutase (Gebhardt & Beck, 1996).

1.3.2. HMG-CoA redutase e estatinas

O enzima HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzimaA)-redutase(HMGR) desempenha um papel central na produção de colesterol no fígado , produzindo cerca de 70 por cento de colesterol total no corpo. Essa enzima catalisa a etapa reguladora na biossíntese do colesterol, por isso, vários estudos avaliam a redução do colesterol através da inibição o enzima HMG-CoA redutase, assim torna-se importante a utilização de inibidores da HMG-CoA redutase, e a busca novos inibidores (Istvan & Deisenhofer 2001).

As estatinas são utilizadas como inibidores da HMG-CoA, tendo o papel de impedir pessoas com níveis de colesterol elevado, sendo sua utilização eficaz , e amplamente prescritos no tratamento hipercolesterolemia e doenças relacionadas.

Ao inibir a HMG-CoA redutase, as estatinas bloqueia a via para a síntese de colesterol no fígado, sendo benéfico e coeso, pois a maior parte do colesterol e produzido internamente, precisamente no fígado utilizando o enzima HMG-CoA.

Quando o fígado já não podem produzir o colesterol, os níveis de colesterol no sangue vai cair (Istvan & Deisenhofer , 2001).

A atuação desses farmacos se dá pela competição dela com o HMG-CoA pela mesma enzima, a HMG-CoA redutase, que catalisa a reação da síntese de colesterol como podemos observar na Figura 4.

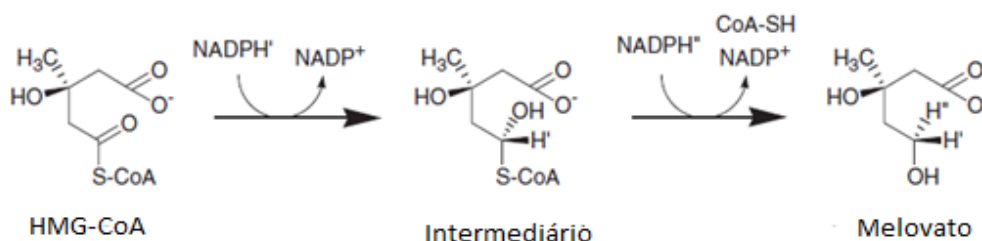


Figura 4. Uma versão reduzida é mostrado aqui, o que evidência as estruturas químicas do material de partida (HMG-CoA) e produto (melovato) desta etapa. **Fonte:** Adaptada Istvan & Deisenhofer et al 2001.

Na década de 70 os produtos naturais com um poderoso efeito inibitório da HMG-CoA redutase, foram descobertos pelo microbiologista japonês Akira Endo num caldo de fermentação de *Penicillium citrinum*, compactina (A), durante uma pesquisa de agentes antimicrobianos. Em 1982 surgiu o primeiro inibidor aprovado para HMG-CoA redutase, a lovastatina, sendo um inibidor de reduções drásticas nos níveis de colesterol (LDL), com poucos efeitos adversos. Quando a lovastatina se tornou disponível para uso (prescrição), os médicos pela primeira vez, tiveram uma obtenção fácil de grandes reduções nos níveis de colesterol plasmático dos seus pacientes (Istvan & Deisenhofer 2001).

O segundo Inibidor, a sinvastatina (B), foi aprovado para comercialização na Suécia em 1988, e subsequentemente em todo mundo, os demais inibidores foram sendo descobertos e conhecidos, como a Pravastatina (descobertos por Sankyo após o fracasso de compactina), em 1991, em 1994, a fluvastatina (C), a atorvastatina (E), em 1997, a cerivastatina (D), em 1998 e a rosuvastatina (F) em 2003. Figura 5 (Istvan & Deisenhofer 2001).

Alguns dos inibidores são produtos de fermentação como a lovastatina, a sinvastatina é um derivado semi-sintético da lovastatina, e a pravastatina é derivada a partir do produto natural compactina por biotransformação, ao passo que todos os outros inibidores da HMG-CoA redutase são produtos totalmente sintéticos.

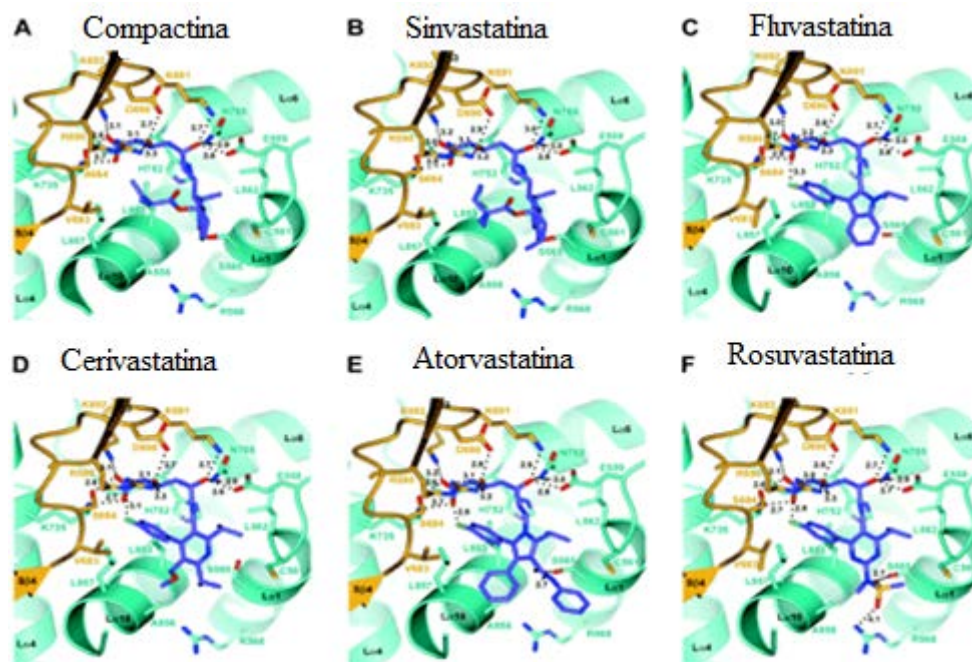


Figura 5. Estrutura tridimensional de vários inibidores de estatina. Modo de ligação de compactina (A), sinvastatina (B), a fluvastatina (C), cerivastatina (D), a atorvastatina (E), e rosuvastatina (F) . As interações entre as metades da HMG das estatinas e da proteína. **Fonte:** Adaptada Istvan & Deisenhofer et al 2001.

Uma comparação entre as seis estruturas complexas ilustrada a cima, ilustra as sutis diferenças nos seus modos de ligação, onde podemos observar como as estatinas se ligam e inibem o seu alvo. É importante destacar que apesar de possuírem estruturas semelhantes, as estatinas tem ações diferentes e seu uso deve ser controlado por recomendação médica. A redução média dos níveis de colesterol LDL atingível com a dose máxima recomendada de diferentes estatinas varia entre 35% e 55% , mas sua utilização requer cuidados, pois elas podem trazer outros problemas associados a quem faz uso desse tipo de medicamento, pois elas possui uma lista enorme de contra-indicações.

Por isso a busca de compostos naturais , que faça diminuir ou ate mesmo anular os efeitos adversos para quem precisa fazer uso , é de extrema importância.

1.4. Stress Oxidativo e Atividade Antioxidante

Existe uma variedade de substâncias extraídas de plantas com atividades antioxidantes encontradas. Algumas famílias de plantas mostraram apresentar atividades biológicas (atividade antioxidante) como Rosáceas, Empetrácea, Ericácea, Grossulariácea, Juglandácea, Asteracea, Punicácea e Zingiberácea (Halvorsen et al., 2002).

Muitas plantas produzem antioxidantes naturais em resposta à presença de espécies oxidantes. Reações com espécies oxidantes podem conduzir à formação de radicais livres e, por sua vez, a sua acumulação leva à ocorrência de stress oxidativo devido ao desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigénio (ROS), ou de azoto (RSN) e os enzimas antioxidantes (Sousa, & Brandão et al 2007). Quando estes são produzidos em excesso podem oxidar lípidos, proteínas e ácidos nucleicos, perturbando as suas estruturas e as suas funções, interferindo assim com o metabolismo celular normal (stress oxidativo) e em último caso, pode levar a morte celular (Rossi et al., 2008). Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem alvos biológicos nas células (Mata et al., 2007).

Por isso a utilização de “chás” uma bebida mais consumidas e mais antigas do mundo, tem vindo a ser considerado como fonte de antioxidantes naturais devido à presença de compostos capazes de inibir e/ou diminuir os efeitos provocados pelos agentes oxidantes.

A produção inevitável de radicais livres pelo organismo, com a consequente exposição celular aos mesmos, fez com que, adaptativamente, os organismos tenham vindo a desenvolver mecanismos de defesa (intra e extracelulares), que lhes permitam salvaguardar o equilíbrio de que necessitam para o funcionamento celular normal, minimizando os efeitos deletérios causados pelos agentes oxidantes. A grande concentração de antioxidantes encontrados em plantas deve-se à necessidade de proteção das células vegetais contra os radicais livres gerados pelo stress oxidativo, provocado pela exposição aos raios solares e ao oxigénio (Valentão et al , 2002; Ferreira & Abreu, 2007; Han et al., 2007).

Como antioxidantes naturais destacam-se o ácido ascórbico, a vitamina E e o β -caroteno. São utilizados também antioxidantes sintéticos, como o butil-hidroxianisol (BHA) ou hidroxitoluenobutilado (BHT), mas requerem cuidados e controle uma vez que para serem usados têm de garantir segurança, devidos seus possíveis efeitos mutagénicos e carcinogénicos (Tepe et al., 2005).

Determinadas plantas têm uma elevada concentração de compostos com capacidade antioxidante e, ao longo do tempo, têm vindo a ser utilizadas na medicina tradicional para prevenção ou tratamento de múltiplas patologias. Nos dias de hoje, estas plantas continuam a ter um crescente interesse na fitoterapia preventiva e curativa (Serrano et al., 2007).

No dia-a-dia a existência desses compostos são encontrados na maioria dos alimentos ingeridos diariamente numa dieta equilibrada (sementes, cereais, legumes, frutos, folhas, raízes, especiarias e ervas), que possui na sua constituição diversas moléculas naturais bioativas, que se designam, genericamente, por compostos fitoquímicos, tendo já sido

evidenciado o seu potencial na modificação favorável do metabolismo humano, no que se refere à prevenção de doenças crónicas e degenerativa (Anjo et al, 2004).

Atribui-se o efeito antioxidante das plantas, à presença de grupos hidroxilos nos seus compostos fenólicos. Os compostos fenólicos desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais, que permitem a sua atuação como agentes redutores, dadores de hidrogénio (Valentão et al, 2002).

São vários os compostos extraídos de espécies de Asterácea que têm sido estudados pelas suas propriedades antioxidantes. A *C. carduculum* conhecido como alcachofra, pertence a mesma família da *Vernonia condensata*, planta em estudo nesse trabalho. Essa planta é utilizada para o tratamento de náuseas, e para reduzir os níveis de colesterol e triglicéridos no sangue. Devidos as suas atividades biológicas, esta planta tem merecido uma atenção especial. Estudo referidos na literatura indicam que esta planta é bom antioxidante natural (Proença da Cunha et al., 2003).

A busca de antioxidantes naturais tem sido intensificada nos últimos anos no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os antioxidantes sintéticos ou fazer associação entre eles.

1.5. Objectivos

O trabalho experimental que se apresenta teve como principal objetivo estudar os mecanismos moleculares subjacentes às actividades etno-farmacológicas descritas para o «chá» de Boldo-baiano, ou seja, facilitar o processo digestivo e reduzir o colesterol na corrente sanguínea com diminuição de problemas de aterosclerose. Deste modo traçaram-se como objectivos parciais:

- a) determinação da composição química dos extractos de modo a poder justificar e interpretar as actividades biológicas que fossem encontradas;
- b) determinação da capacidade inibitória do enzima acetilcoliensterase, responsável pela motilidade do tracto gastrointestinal;
- c) determinação da actividade antioxidante que poderá ajudar a contariar processo inflamatórios na aterosclerose;
- d) Estudo da acção dos «chás» sobre a permeação de colesterol e sobre a inibição do enzima HMGR que poderá contribuir para explicar a acção na redução do colesterol na corrente sanguínea.

Capítulo II – Materiais e Métodos

2.1. Materiais

2.1.1. Material Vegetal

Nesse trabalho utilizou-se folhas de *Vernonia condensata* cultivada na Horta de Plantas Medicinais da UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz, no estado da Bahia, Brasil). Os extratos de *V. condensata* foram preparados com 40g de folha fresca para 400mL de água. As amostras foram coletadas no mês de novembro de 2012 na região atrás referida.

A exsiccata da planta foi depositada no Herbário da Universidade Federal da Bahia, (Brasil) com os seguintes códigos: HUESC n. 16275.

2.1.2. Reagentes

Todos os produtos químicos utilizados nesse trabalho foram de grau analítico.

No estudo da actividade inibitória do enzima acetilcolinesterase utilizou-se acetilcolinesterase (AChE) tipo VI-S, extraído de enguia elétrica contendo 349 U/mg sólido e 411 U/mg de proteína, 5,5'-Ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB ou reagente de Ellman), iodeto de acetilcolina (AChI) e tampão Tris, obtidos da Sigma®. O reagente DTNB foi dissolvido em tampão Tris 50 mM (pH 8,0) contendo NaCl (50 mM) e $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (20mM), ambos comprados à Panreac®.

O estudo da inibição da HMG - CoA redutase foi efetuado usando um kit adquirido pela Sigma (Barcelona, Espanha) e o metanol utilizado nos ensaios foi adquirido à Merck (Darmstadt, Germany).

Para o ensaio da actividade antioxidante utilizou-se 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) da Aldrich® e metanol obtido da Panreac®.

No estudo do metabolismo *in vitro* pela acção dos sucos gástrico e pancreático artificial utilizou-se pepsina da Fluka® contendo 0,53 U/mg e pancreatina isolada de pâncreas de porco, da Sigma®. A solução de suco gástrico artificial foi preparada com NaCl (2 mg/mL) sendo seu pH ajustado a 1,2 recorrendo a HCl 1 M (HCl) obtido de Riedel de Haen® e Pepsina (3,2 mg/mL). A solução de suco pancreático artificial consistiu em tampão K-fosfato 50 mM pH 8,0 e pancreatina (2,5mg/mL). Para o tampão fosfatos utilizou-se fosfato de sódio dibásico ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) e fosfato de sódio monobásico ($NaH_2PO_4 \cdot 7H_2O$) da Merck®.

Nas análises por HPLC-DAD e por LC-MS realizadas durante o trabalho utilizou-se um gradiente linear de uma mistura composta de metanol, ácido trifluoroacético (0,005%

TFA) ambos Merk® e gradiente linear composto de ácido fórmico a 1,0% (Panreac®), acetonitrilo e metanol Merk® , respectivamente(Darmstadt, Germany).

Os padrões utilizados para a identificação dos compostos HPLC-DAD ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido rosmarínico e cinarina foram comprados à Sigma®. (Falé et al 2014).

A manutenção das linhagens celulares Caco-2 e HEP-G2 foi realizada em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), FBS (*Fetum Bovine Serum*) e 5% de antibiótico Pen-Strep (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL) comprados à Lonza®, à excepção do FBS, obtido da Cambrex®.

Para a tripsinização das células utilizou-se tripsina e PBS da Lonza®. As diluições dos extractos foram realizadas em HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) e DMEM Lonza®.

Nos estudos de citotoxicidade foi utilizado brometo de 3- [4,5-dimetil-tiazol-1-il]-2,5-difeniltetrazólio(MTT),edimetilsulfóxido(DMSO) ambos da Sigma® e metanol obtido pela Merck (Darmstadt, Germany). A ezetimiba, medicamentos disponíveis no mercado para reduzir o colesterol, foram da Sanofi-Aventis (Porto Salvo, Portugal)

Para o estudo da permeação do colesterol (5 mM) esse foi adquirido a Sigma.As diluições dos extractos e do colesterol foram realizadas em HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) obtidos da Lonza®.A quantificação do colesterol foi realizada pela HPLC-DAD, utilizando um gradiente isocrático de 50% de metanol e 50% de acetonitrilo ambos obtidos da Merk® (Darmstadt, Germany).

2.1.3. Linhas celulares

As linhas celulares utilizadas foram HEP-G2 (ATCC#HB-8065), uma linha celular derivada do fígado e Caco-2 (ATCC#HTB-37), uma linha de células epiteliais do adenocarcinoma colo-rectal.

2.1.4. Equipamento

As análises foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido HPLC (*High Precision Liquid Chromatography*) LaChrom Elite VWR Hitachi.

A separação foi realizada com uma coluna LiChroCARTs 250-4 *LiChrospher* 100 RP-8 (5µm) e detecção foi realizada entre 200 e 600 nm com um detector do tipo DAD (diode array detector) L-2455 (VWR, EUA), e com a ajuda de um software *Xcalibur*.

A análise por LC-MS e LC-MS/MS foram efetuadas num cromatógrafo líquido sistema Surveyor Plus modular LC ligado a um espectrómetro de massa de armadilha de iões LCQ Duo equipado com uma ionização por electrospray (ESI) fonte, a partir de Thermo Scientific (Bremen, Alemanha). A coluna usada foi a mesma utilizada para a análise HPLC. As leituras de absorvência foram realizadas num espectrofotómetro feixe duplo UV-Vis M350 da Camspec. As leituras de absorvência em microplacas foram lidas num espectrofotómetro multi-canal leitor de microplacas Tecan®*Sunrise*.

As condições de esterilidade/asépsia do trabalho foram garantidas por uma câmara de fluxo laminar Esco® *Class II Biohazard Safety Cabinet*. A incubação de amostras foi realizada numa estufa *Shel Lab CO Series* da Sheldon Mfg.Inc®. As observações celular foi verificada num microscópio óptico Motic® *AE21*.

Utilizou-se uma balança Mettler Toledo ($\pm 0,1$ mg) na pesagem dos reagentes sólidos. A agitação e *vortex* de soluções foram realizadas num agitador Heidolph® *REAX 2000*. As amostras foram centrifugadas em Mini Spin F45-12-11 da *Eppendorf*.

Utilizou-se um medidor de pH WTW® *inoLab* na preparação de soluções que exigiam o controlo deste parâmetro.

2.2 Métodos

2.2.1. Preparação dos Extractos Aquosos

Os extractos de *Vernonia condensata* foram preparados por decocção e infusão. Para a preparação dos extractos utilizou-se material vegetal fresco finamente triturado, utilizando 40 g desse material vegetal, e colocado em 400 mL de água destilada em ebulição durante 10 minutos (decocção). Depois de arrefecido, a decocção do extracto foi filtrada em papel de filtro *Whatman* 1. Preparam-se infusões usando a mesma quantidade de planta no mesmo volume de água que ferveu previamente e se verteu sobre as folhas, ficando durante 10 minutos em extracção (infusão). Assim os extractos foram congelados e posteriormente, iniciou-se o processo de liofilização recorrendo ao liofilizador. A liofilização é um processo de desidratação utilizado para assegurar a preservação de materiais delicados. O processo de liofilização leva á obtenção de extracto seco e em pó. Com um rendimento 3% decocção e 2,5% infusão. Estes extractos foram preparados no Brasil Dr^a Larissa Corrêa do Bomfim Costa. Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus, Baia, Brasil.

2.2.2. Determinação de Actividades Biológicas

2.2.2.1. Determinação da Actividade Antioxidante

Para o ensaio da actividade antioxidante do extracto, foi utilizado um teste clássico o DPPH descrito por Tepe et al.,(2007), e baseia-se na redução do radical livre estável o DPPH. O DPPH é um radical livre estável, devido à deslocalização do seu electrão por toda a molécula, o que também justica o forte tom violeta apresentado pela molécula em solução. Na presença de uma substância com propriedade antioxidantes, e capaz de doar um protão, o DPPH é reduzido, perdendo sua cor violeta tal como descrito na figura 6.

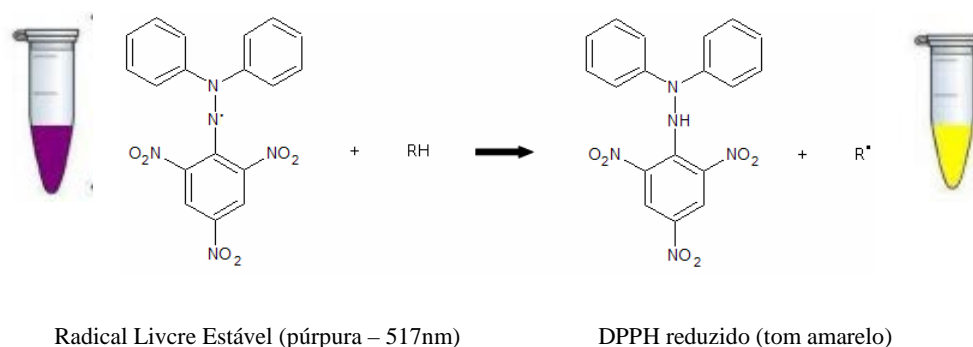


Figura 6 - Esquema representativo da extinção do DPPH na presença de uma amostra com capacidade de captação do radical. **Fonte** : Adaptado de Molyneux et al ,2004.

Adicionou-se 10 µl de extracto aquoso a 1,0 ml de solução metanólica de DPPH 0,02% (2 mg em 100 ml em metanol). Esta mistura foi incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente e mediu-se a absorvência a 517 nm contra um branco contendo metanol. Foi realizada uma reacção controlo, utilizando água no lugar da solução de extracto,e foi considerada como 100% da actividade antioxidante.

O ensaio foi realizado em várias concentrações e em triplicado para cada uma das concentrações. A actividade antioxidante foi calculada segundo a fórmula:

$$AA(\%) = 100 - (A_{\text{amostra}} / A_{\text{controlo}}) \times 100$$

Em que AA(%) actividade antioxidante; A_{amostra} e A_{controlo} correspondem à média da absorvência da reacção controle e absorvência da reacção com determinada concentração de composto, respetivamente. Recorrendo à análise da regressão linear, a concentração de extracto correspondente a 50% de actividade antioxidante (EC_{50}) foi obtida por interpolação gráfica da actividade antioxidante em função da concentração do extracto de planta.

2.2.2.2. Inibição da Actividade da Acetilcolinesterase

O estudo da inibição da actividade enzimática de Acetilcolinesterase (AChE) foi realizada segundo o método de Ellman descrito por Ingkanian et al. (2003), com ligeiras modificações indicado em Fale et al., 2009.

Neste método a acetiltiocolina foi usada como substrato para o AChE, originando acetato e tiocolina. Da reacção de tiocolina com o 5,5'-Ditiobis (2-ácidonitrobenzóico) (DTNB) resulta 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e o ião 5-tio-2nitrobenzoato (TNB) que tem um pico de absorvência a 405 nm. Estas reacções encontra-se apresentado na figura 7.

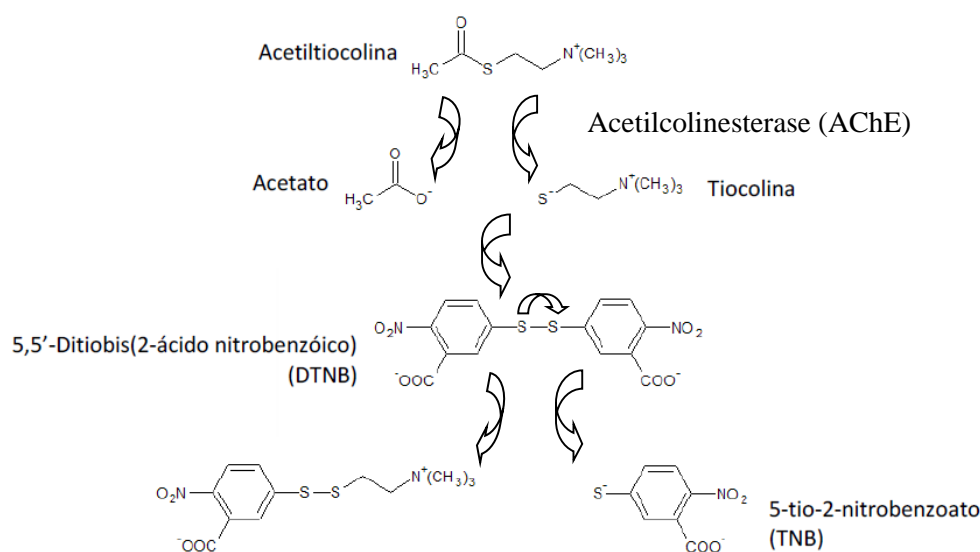


Figura 7– Esquema reaccional que ilustra a reação da AChE com acetiltiocolina, resultado final, no produto corado, TNB. **Fonte** : Adaptado de Frasco et al., 2005.

Numa cuvete foram adicionados 325 μL de tampão Tris 50 mM (pH 8,0) , 100 μL de extracto e uma solução de 25 μL do enzima acetilcolinesterase contendo 0,26 U / mL) . Esta mistura foi incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente, em seguida, 75 μL AChI (0,023 mg / ml) e 475 μL de solução DTNB (3 mM) foram adicionados para iniciar a reacção. Os valores

da absorvância a 405nm foram lidos durante 5 minutos contra um branco em que a solução de enzima foi substituída pelo mesmo volume de tampão Tris 50 mM . A taxa inicial de reacção foi determinada graficamente. A reacção de controlo foi realizado utilizando água destilada em vez da amostra, em que se considerou que o enzima tinha , neste caso, 100% de actividade.

O ensaio foi realizado em várias concentrações e em triplicado para cada uma das concentrações. Para determinar a percentagem de inibição da actividade do enzima, pela a solução do extracto, recorreu-se à seguinte equação:

$$I (\%) = 100 - (A_{\text{amostra}} / A_{\text{controlo}}) \times 100$$

Em que I(%) é a percentagem de inibição enzimática, A_{controlo} é a média da absorvência da reacção controlo e A_{amostra} é a absorvência da reacção com determinada concentração de composto. A concentração de composto, cuja inibição da actividade enzimática é 50% (IC_{50}) foi determinada através da regressão obtida pela representação gráfica da percentagem de inibição *versus* concentração de composto.

2.2.2.3. Inibição da Actividade da HMG-CoA redutase

A Inibição da HMG-CoA- redutase , foi estudada utilizando um kit adquirido à Sigma (Barcelona, Espanha). O extrato de *Vernonia condensada* apresentou uma alta absorvência (340 nm) inicial. Por conseguinte, a reacção enzimática foi realizada, tal como sugerido pelo fornecedor , mas o NADPH foi quantificada usando o método descrito por Mozzicafreddo *et al.*,2010 utilizando o HPLC.

As amostras foram tomadas a 0, 1, 2, 4 e 6 minutos, a reacção foi interrompida pela adição de 50 % de metanol e a quantidade de NADPH foi medida por HPLC -DAD, utilizado e descrito anteriormente, sendo adequadamente sensível, capaz de monitorizar tanto a nível das espécies envolvidas em equilíbrio em uma única análise e a cinética de reacções HMG-CoA catalisada (figura 8). Foram injetados 150µl da amostra em 400 µl MeOH(50%) e o método analítico é constituído como mostra a tabela 1.

Tabela 1: Gradiente utilizado para o método analítico no HPLC.

t(mim)	Fluxo(mL/min)	100 mM H₂PO₄	Metanol
0	0,8	95	5
15	0,8	70	30
20	0,8	20	80
23	0,8	20	80

Os ensaios foram realizados em triplicado. A actividade enzimática foi medida na presença de várias concentrações de *Vernonia condensada* e a inibição foi a percentagem de redução em comparação a actividade da enzima sem inibidor. O valor de IC₅₀ foi calculado pela inibição vs concentração de inibidor .

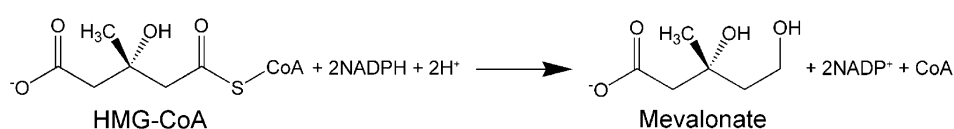


Figura 8. Representação esquemática da reação enzimática HMG-CoA redutase. **Fonte:** <http://sobregorduras.blogspot.com/2011/05/colesterol.html>.

2.2.3. Análise dos extractos por HPLC-DAD

Para a análise dos extractos vegetais por HPLC-DAD utilizou-se dois métodos diferentes para melhor eluição dos compostos presentes no extracto de *Vernonia condensata*: no qual esses dois métodos foram composto por solução A (metanol) e B (0,05% TFA em água MiliQ), mas a variação da percentagem de cada solução foi diferentes. Através da variação da percentagem de cada um dos eluentes ao longo do tempo da corrida de HPLC, criou-se um gradiente susceptível de gerar uma separação eficiente dos diferentes componentes do extracto, onde no final foi escolhida o melhor método de eluição. Nas tabelas 1 e 2 apresentam-se os dois métodos utilizado para o HPLC analítico.

Tabela 2: Gradiente utilizado para as corridas de HPLC analítico.

t(mim)	Fluxo(mL/min)	Metanol	TFA(água MiliQ)
0	0,8	30	70
40	0,8	70	30
45	0,8	70	30
47	0,8	30	70
50	0,8	30	70

Tabela 3: Gradiente utilizado para as corridas de HPLC analítico

t(mim)	Fluxo(mL/min)	Metanol	TFA(água MiliQ)
0	0,8	20	80
20	0,8	80	20
30	0,8	20	80

Os padrões foram executado sob as mesmas condições, usando soluções a 0,1 mg / ml em metanol e a detecção foi levada a cabo entre 200 e 600 nm com um detector de arranjo de diodos. O volume de injeção foi de 25 µL de uma solução de extracto aquoso (1 mg/mL), utilizando um injetor automático.

2.2.4. Identificação dos Compostos Maioritários do extracto aquoso de *V. condensata* por Espectrometria de Massa (MS)

Para identificação dos compostos maioritários do extracto aquoso de *V. condensata* utilizou-se um espectrómetro de massa do tipo *ion trap* LCQ Duo da Thermo Finnigan equipado com uma fonte de ionização por *electrospray*.

As fracções foram injectadas na bomba de seringa a uma velocidade constante de 5µl/min. Ajustou-se o fluxo de gás nebulizador (azoto) para 40 (unidades arbitrárias), o fluxo de gás auxiliar (azoto) para 20 (unidades arbitrárias), a voltagem aplicada na fonte foi de 4.5 kV e a temperatura do capilar a 220 ° C. Os espectros de massa foram adquiridos no modo negativo numa gama de m/z (massa/carga) 100-1000.

Na recolha das fracções do extracto por HPLC- DAD, no gradiente de eluição o ácido trifluoroacético 0,05% foi substituído por ácido fórmico 0,1% de forma a obter uma melhor resolução no espectrómetro de massa. A maior parte dos compostos presentes no extracto estudados foram identificados por pesquisa de banco de dados de espectro de massa usando a base de dados MASSBANK e comparação com bibliografias.

2.2.5. Ensaio de Metabolismo *in vitro* do Extracto Aquoso *V. condensata*

2.2.5.1. Digestão por Suco Gástrico Artificial

O método de estudo do metabolismo *in vitro* pelo suco gástrico foi adaptado a partir de Yamamoto et al (1999).

Foi adicionado um volume igual de extracto de *Vernonia condensata*, com concentração correspondente ao IC₅₀ e uma solução de suco gástrico artificial (constitui de 320 mg de pepsina, em 100 ml de solução 0,2% NaCl, pH 1,2 (HCl) e no controle substituiu-se o extracto em estudo por igual volume água destilada. A mistura reaccional foi incubada durante 4 horas a uma temperatura 37 ° C , num banho termostaticada Lauda®.

Amostras foram recolhidas instante inicial e no fim de cada hora retirando 100µL da mistura reaccional. A paragem da reação foi realizada adicionando 500 mL de metanol arrefecido com gelo, centrifugou-se a 5000g durante 5 min numa Mini Spin F45-12-11 da Eppendorf®. O sobrenadante foi recolhido para análise posterior por HPLC -DAD, e para o estudo da actividade antioxidante e a inibição da actividade do enzima acetilcolinesterase como descrito em 2.2.2.1 e 2.2.2.2(Capítulo II) respectivamente.O ensaio foi realizado em triplicado.

2.2.5.2. Digestão por Suco Pancreático Artificial

O método de estudo do metabolismo *in vitro* pelo suco pancreático foi adaptado a partir de Yamamoto et al (1999).

Foi adicionado um volume igual de extracto de *Vernonia condensata*, com concentração correspondente ao IC₅₀ e uma solução de suco Pancreático artificial (constitui 250 mg de pancreatina, em 10 ml de tampão fosfato 50 mM , pH 8) e no controlo substituiu-se o extracto em estudo por igual volume água destilada. A mistura reaccional foi incubada durante 4 horas a uma temperatura 37 ° C, num banho termostaticada Lauda®.

Amostras foram recolhidas no instante inicial e no fim de cada hora retirando 100µL da mistura reaccional. A paragem da reacção foi realizada adicionando 500 mL de metanol arrefecido com gelo, centrifugou-se a 5000g durante 5 min numa Mini Spin F45-12-11 da Eppendorf®. O sobrenadante foi recolhido para análise posterior por HPLC -DAD, e para o estudo da actividade antioxidante e a inibição da actividade do enzima acetilcolinesterase como descrito em 2.2.2.1 e 2.2.2.2 (Capítulo II) respectivamente. O ensaio foi realizado em triplicado.

2.2.6. Ensaio em células Caco-2 e Hep-G2

O crescimento de células Caco-2 e HepG2 foi feito recorrendo ao método descrito por Kern et al. (2003).

Semearam-se as células Caco-2 e Hep-G2 em caixa de Petri e meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modifies Eagle Medium). O meio de cultura foram suplementados com 10% soro bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina, 100 U/mL de estreptomicina e a adição de 2 mM L-glutamina, numa estufa a uma temperatura 37°C com 5% de CO₂. O meio foi substituído a cada 48h-72h e as células tripsinizadas quando confluência atingiu cerca de 80%. Após atingida a confluência celular esperada que foi verificada ao microscópio óptico, as células são tratadas. Removeu-se o meio de cultura e lavou-se a placa de cultura com 3 mL de PBS (Tampão fosfato salino). Em seguida adicionou-se 1 mL de tripsina para ajudar a separar as células e incubou-se durante 5 minutos a uma temperatura 37°C na estufa. No caso de células Hep-G2, procedeu-se à sua contagem num hemacitómetro. Foi adicionado meio DMEM, num volume de 100 µl de forma a obter uma concentração final de 50000 células/mL, ou seja, 5000 células por poço na microplacas de 96 poços.

No caso das células Caco-2, as células foram suspensas em 20 mL de meio DMEM, adicionando 100µL por poço na microplaca de 96 poços. As células foram cultivadas durante 120 h (Caco-2) ou 48 h (Hep-G2). Este trabalho foi executado numa câmara de fluxo laminar Esco® de forma a evitar contaminações.

2.2.6.1. Determinação da Citotoxicidade em Células Caco-2 e Hep-G2

A citotoxicidade dos extractos foi avaliada pelo método calorimétrico MTT, descrito por Chen et al. (2008). Esse método calorimétrico reflete a actividade de um enzima mitocondrial crítico para as actividades químicas e mecânicas das células, o succinato desidrogenase. As células vivas têm capacidade para reduzir o MTT a azul de tripano, através da acção do succinato desidrogenase, enquanto que as células mortas não conseguem realizar este processo. A solubilização do azul de tripano por DMSO permite a obtenção de uma solução corada que pode ser quantificada espectrofotometricamente. Assim, a redução do MTT pode ser determinada de forma quantitativa e utilizada como indicador da viabilidade celular. O sal amarelado MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) é reduzido por desidrogenases do mitocôndrio de células viáveis, formando cristais púrpura insolúveis (figura 9).

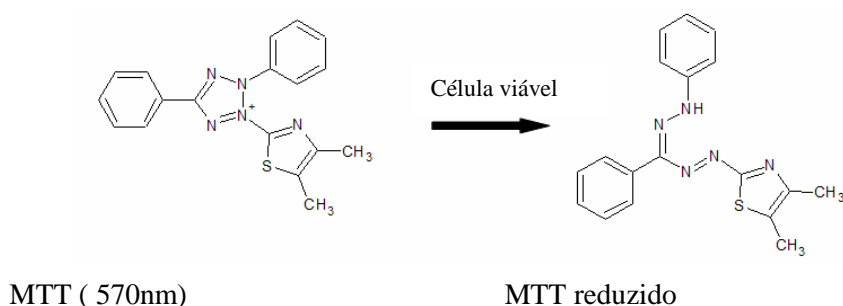


Figura 9. Esquema reacional da redução do MTT. **Fonte :**Stepnowski, P., Skladanowski, A.C., Ludwiczak, Laczynska, E. (2004).

Após atingida a confluência celular substituiu-se o meio das células por concentrações crescentes de extracto nas microplaca de 96 poços.

As células foram incubadas durante 24 h a uma temperatura de 37 ° C em estufa com 5 % de CO₂. Após 24 horas de incubação a 37°C, a solução anteriormente aplicada foi substituída por uma solução MTT (5 mg/mL em meio de cultura) e incubou-se, nas mesmas condições, durante 2 horas.

Após 2 horas de incubação, retirou-se a solução de MTT e aplicou-se 100 µL de DMSO em cada poço. Por fim, e após 1 hora de incubação à temperatura ambiente com DMSO, efetuou-se a leitura óptica.

A leitura óptica foi realizada num espectrofotómetro multi-canal -leitor de microplacas - Tecan Sunrise™ a 570 nm com um comprimento de onda de referência a 630 nm.

Os ensaios foram realizados em duplicado. A absorvência lida é proporcional ao número de células viáveis. Assim, é possível determinar a viabilidade/citotoxicidade celular calculando o IC₅₀, que foi comparada com as células de controlo sem extracto de *Vernonia condensata*. O IC₅₀ representa a concentração do extrato que provoca a diminuição de 50 % da viabilidade celular, este valor foi calculado a partir de uma regressão linear.

2.2.7. Estudo da Permeação da Barreira Intestinal e Permeação dos Compostos do extracto aquoso de *Vernonia condensata*

Para o estudo da permeação do colesterol e dos compostos presentes no extracto foram semeadas células Caco-2 em placas *transwell* com 12 cavidades com proximamente 10,5 milímetros de diâmetro e um tamanho de poros de 0,4 µm (BD Falcon™). A fim de aproximadamente 21-26 dias as monocamadas estava e diferenciadas.

Estas membranas são adequados para estudos de permeabilidade quando verificada com um teste simples no qual na parte baso-lateral coloca-se 1000µl de PBS e na parte da apical DMEM, deixar na estufa a uma temperatura de 37 ° C em uma estufa com 5 % de CO₂ durante 2 horas. Em seguida e recolhidas a parte baso-lateral e apical sendo colocados em uma microplaca, como é um teste simples vê-se a diferença de coloração das partes, na qual mostra-se que não houve a passagem do meio DMEM da parte apical para a baso-lateral o que indica que as células estão prontas para o ensaio e ainda confirma-se no espectrofotómetro.

Para iniciar o estudo, removeu-se o meio DMEM e adicionou-se HBSS cuidadosamente de forma realizar uma lavagem das células e remover todo o meio de cultura. Em seguida no lado apical foi adicionado uma solução preparada que contém uma solução de colesterol (20 mg/ 2ml em HBSS), com o extracto *V. condensata* numa concentração não tóxica em HBSS (1 mg / ml de extracto) e no lado baso-lateral foi colocado 1,5 mL de meio HBSS. As células ficaram em contacto com a solução, num período de 6h a uma temperatura de 37 ° C em uma estufa com 5 % de CO₂. As soluções foram recolhidas de ambos os lados apical e baso-lateral e analisadas por HPLC –DAD. Foi também analisada a parte intracelular, onde adicionou-se 1 mL de água destilada para suspender as células da e centrifugou-se a 5433 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e analisado por HPLC-DAD, juntamente com as restantes amostras.

Os ensaios foram efetuados em triplicado. O controlo foi realizado utilizando solução de HBSS sem extracto vegetal, no lado apical.

Foi realizado neste trabalho um estudo com o extracto *V. condensata* em contacto com as células num período de 24 horas, sem a presença da solução de colesterol referida a cima. Dessa forma foi adicionado no lado apical uma solução de *Vernónia condensata* numa concentração não toxica em meio DMEM (1 mg / ml de extracto), e no lado baso-lateral foi colocado 1,5 mL de meio HBSS no qual ficou em contacto com as celulas num periodo de 24 horas a uma temperatura de 37 ° C , em uma estufa com 5 % de CO₂. Após as 24h adicionou-se a solução de colesterol (20 mg/ 2ml em HBSS) na parte apical juntamente com extracto que foi adicionado anteriormente, no qual essa solução de colesterol ficou em contacto com o boldo e as células num período de 6h a uma temperatura 37 ° C, em uma estufa com 5 % de CO₂. As soluções foram recolhidas de ambos os lados apical e baso-lateral e analisadas por HPLC – DAD.

Para quantificar a permeação de colesterol, 25 µl de cada uma dos lados foram injectados no HPLC - DAD e a separação foi realizada no modo de isocrática utilizando 50 % de metanol e 50 % acetonitrilo durante 15 minutos com um fluxo de 1 ml / min, a um comprimento de onda a 210 nm.

Para o estudo da biodisponibilidade dos composto presentes no extracto de *Vernonia condensata*, foi utilizado o mesmo procedimento descrito a cima. A identificação dos compostos presentes nos extracto foi determinada aplicando no lado apical uma solução do extracto numa concentração não toxica em HBSS (1 mg / ml de extracto) e no lado baso-lateral foi colocado 1,5 mL de meio HBSS no qual ficou em contacto com as células , num período de 6 h a uma temperatura de 37 °C em uma estufa com 5 % de CO₂.A identificação foi monitorizada por meio de HPLC injetando 25 µl amostra em um gradiente composto de solução A (0,05% de ácido trifluoroacético), e a solução B (metanol) como se segue: 0 min, 80% A e 20% B, 20 min 20% A e 80% B; 25 min, 20% A e 80% de B, com um fluxo foi de 1 ml / min e a detecção foi efetuada entre 200 e 500 nm com um detector de arranjo de diodos.

Capítulo III – Resultados e Discussão



3.1. Composição do Extracto Aquoso de *Vernonia condensata*

No extracto de *V. condensata* percebe-se uma grande quantidade de compostos ativos importantes, os flavonoides (figura 1). Estes compostos são conhecidos por ter uma grande quantidade de atividades bioquímicas (Narayana et al., 2001).

Recentemente, estudos evidenciou que alguns extratos como o *Plectranthus barbatus* (falso-boldo), *Peumus boldos* (boldo-do-chile) e *C. cardunculum* (alcachofra), são plantas extensamente utilizadas sob a forma de “chás”, possui uma boa atividade antioxidantes e inibitória da AChE, deste modo, protege o organismo da ação dos radicais livres trazendo inúmeras vantagens face ao combate de variadas doenças, e contrubui também para a sua ação protetora a nível neurológico e digestivo (Falé et al 2010).

O extracto aquoso *Vernonia condensata* vulgarmente conhecido com “boldo baiano”, outra espécie de boldo, apresenta na sua constituição compostos já conhecidos, como o ácido clorogênico e a cinarina. Eles se destacam-se pela sua importância na medicina popular, por possuir propriedades cujos efeitos já são conhecidos e comprovados em outros trabalhos (Falé et al 2010) (Figura 10).

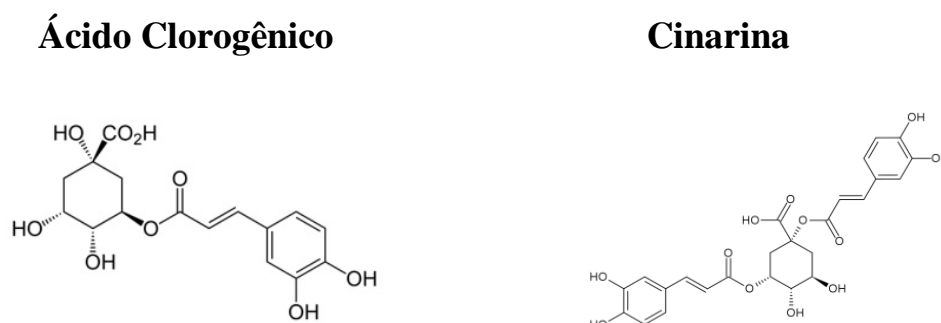


Figura 10. Estruturas químicas dos principais compostos detectados nos extractos aquosos de *V. condensata*.
Fonte: <http://www.wikipedia.org>.

3.1.1. Identificação dos constituintes maioritários do extracto aquoso

Um dos objetivos desse trabalho era a identificação dos compostos presentes no extracto aquoso de *V. condensata*. Para a identificação dos compostos maioritários do extracto aquoso de *Vernonia condensata* decocção e infusão em estudo, utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por diodos (HPLC-DAD) e espectrometria de massa (LC-MS) permitindo a análise simultânea de vários compostos.

Esta identificação preliminar é baseada no tempo de retenção dos compostos e no seu espectro de absorção UV-visível, comparativamente a padrões cromatográficos sob as mesmas condições. O cromatograma encontra-se na figura 11, e a identificação dos principais picos por LC-MS pode ser visto na Tabela 4.

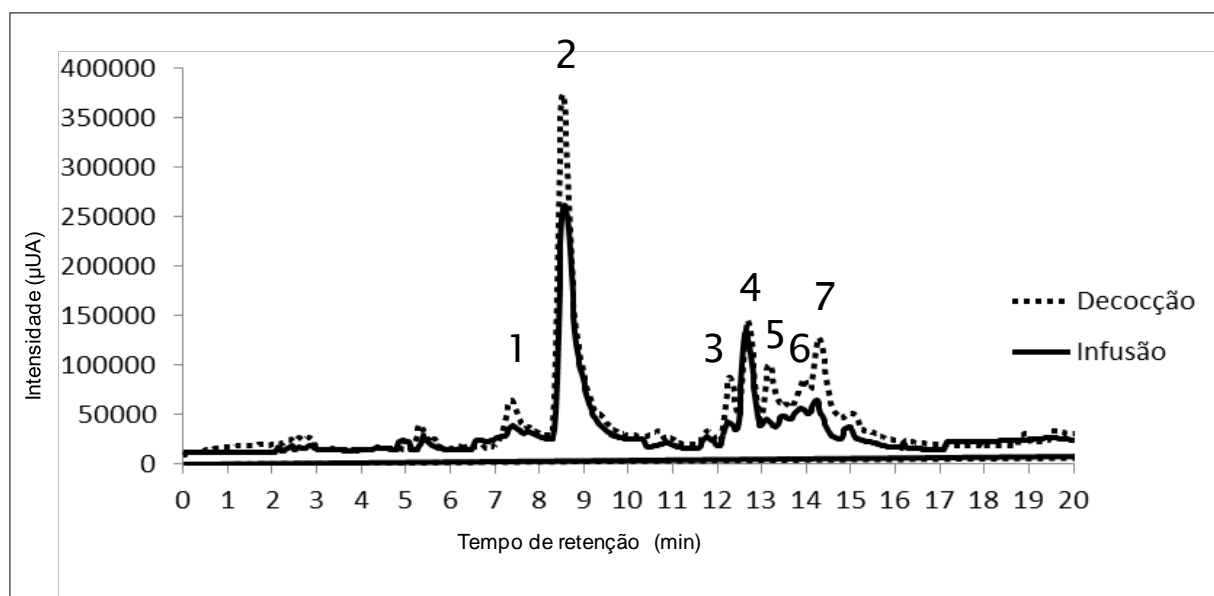


Figura 11. Perfis cromatográficos obtido por HPLC para os extractos aquosos de *V. condensata* decocção e infusão.

Analisado o cromatograma a cima, observa-se que os extractos aquosos de *V. condensata* apresentam na sua constituição vários compostos, e podemos analisar que cromatograma mostrou que o boldo quando preparado por infusão e por decocção apresentou um idêntico perfil cromatográfico, mas que estes possui uma pequena variação quantitativamente na composição do extracto quando este é preparado por decocção comparativamente a infusão. Assim apartir dessa observação optou-se por numerar os picos de modo a facilitar a comparação entre os extractos decocção e infusão, onde verificou uma ligeira modificação de alguns picos.

No extracto aquoso de *V. condensata*, foi possível detectar sete picos maioritários com os seguintes tempos de retenção (Tr): 7.5 mim (pico 1); 8.6 mim (pico 2); 12.4 mim (pico 3), 12.9 mim (pico 4), 13.4 mim (pico 5), 14.0 mim (pico 6) e 14.5 mim (pico 7).

Comparando o Tr dos picos maioritários de ambos os extractos aquosos de *Vernonia condensata* verifica-se que são bastante semelhantes, entretanto percebe-se pequenas variações, sendo essas variações relacionada com a maior extração dos compostos presentes

no extracto decocção, onde conseguimos obter um maior rendimento nos picos 2, 5, 6 e 7, como mostra a figura 11.

Com a análise mais detalhada do comatograma acima, optou-se nesse trabalho dar continuidade ao extracto aquoso preparado sob a forma de decocção uma vez que este apresentou um maior rendimento na extracção dos compostos, quando comparada com a forma de infusão e porque, em geral, as atividade biológicas e maior do que as infusões. A identificação dos composos do extracto podemos observar na tabela 4.

Tabela 4 - Identificação dos compostos do extracto aquoso de *Vernonia condensata* decocção por espectrometria de massa.

HPLC Pico	Tempo de retenção (min)	Íon precursor (m/Z)	Product ions m/z (Rel. Ab. %) Ms ²	Compostos
1	7.5	353	259 (11), 179 (62), 173 (100), 135 (11)	Ácido Cafeoilquínico
2	8.6	353	179 (12), 191(100), 192 (10)	Ácido Clorogênico
3	12.4	515	353 (100), 335 (11), 299 (5), 255 (5), 203 (6), 191 (5), 179 (9), 173 (12)	Ácido Dicafeoilquinico
4	12.9	515	353 (100), 203 (1), 191 (3), 179 (2), 173 (1)	Ácido Dicafeoilquínico
5	13.4	515	353 (100), 335 (3), 191 (9), 179 (1)	Cinarina
6	14.0	461	381 (5), 369 (2), 357 (8) 355 (2), 327 (4), 285 (100); [285] 285 (100); 243 (1), 241 (2), 217 (1), 199 (1)	luteoline/camferol
7	14.5	515	353 (100), 335 (2), 317 (6), 299 (21), 255 (8), 204 (3), 203 (17), 179 (3), 173 (7)	Ácido Dicafeoilquínico

O extracto aquoso desta planta em estudo é composto principalmente de ácidos cafeoilquínicos e dicafeoilquínicos. Pode ser visto no cromatograma a cima da figura 11, que o ácido clorogénico (ácido 3-cafeoilquínico) é o principal componente do extracto dessa planta, seguido de cinarina (ácido 1,5-dicafeoilquínico), e outros isómeros do ácido

dicafeoilquínicos que observamos na tabela a cima 4. Estes tipos de compostos fenólicos foram detetados em várias Vernónias espécies (Toyang & Verpoort, 2013).

A identificação e a confirmação dos compostos presentes no extracto aquoso realizou-se por espectrometria de massa e por HPLC-DAD e em seguida comparou-se com os espectros de absorção UV-Visível e Tr dos padrões: ácido cafeico, ácido clorogénico, cinarina e luteolina em HPLC-DAD, com o mesmo sistema de eluição (Falé et al 2013).

Os compostos 1 e 2 foram identificados como ácidos cafeoilquínico, semelhante ao ácido clorogénico. O Composto 2 apresentou o mesmo tempo de retenção que o ácido clorogénico padrão, pelo que foi identificado como o ácido clorogénico, principal componente dessa planta, o qual foi identificado em outras plantas já conhecidas.

Há relatos na literatura que o composto mais abundante na alcachofra é ácido clorogénico (ácido 3 - O- cafeoilquínico), sendo ele responsável pelo resultado positivo obtidos com essa planta (Pandino et al.,2012). Os picos 3 e 4 foram identificados como ácidos dicafeoilquínico. O composto 5 identificado como cinarina. Isto é, um composto também identificado de acordo com os relatos na literatura, sendo um dos principais compostos *C. cardunculus* (alcachofra) (Wang et al.,2003). O composto 6 foi identificado como luteolina - 7 - O- glicosídeo, de acordo com o padrão de fragmentação, também conhecido como um constituinte da alcachofra. O pico 7 foi identificados como composto derivado do ácido cafeico, uma vez que apresentam o espectro típico destes compostos.

Consultado as bibliografias confirmou-se a presença dos compostos principais do extracto aquoso de *V. condensata* e como o estudo realizado com a alcachofra (Pinelli et al. , 2007). Foi observado em um estudo com 12 membros da família Asteracea a presença dos compostos identificado com estrutura semelhante a ácido cafeico o que segundo Jaiswal, Kiprotich & Kuhnert 2011 é característico da família Asterácea.

Os espectros de absorção UV-Visível para cada um dos picos maioritários do extracto aquoso de *V. condensata*, encontram-se representado na Figura 12.

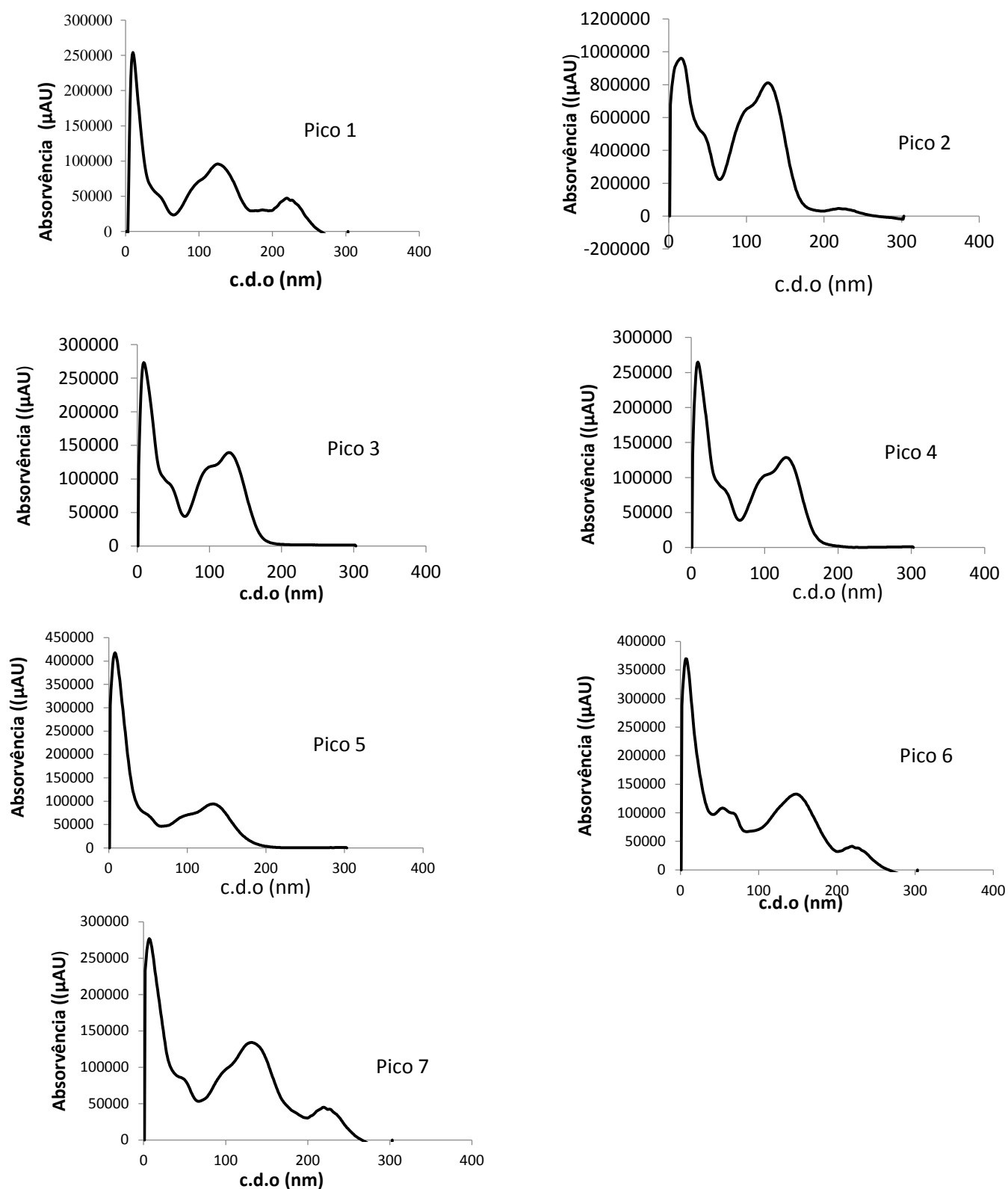


Figura 12 - Espectros de absorção UV-Visível obtidos por HPLC-DAD para os sete picos maioritários do extracto aquoso de *V. condensata* (1mg/mL): P1 (Tr = 7,5 min), P2 (Tr = 8,6 min), P3 (Tr = 12,4 min), P4 (Tr = 12,9 min), P5 (Tr = 13,4 min), P6 (Tr = 14,0 min), P7 (Tr = 14,5 min).

3.1.2. Análise do extracto aquoso por Espectrometria de Massa (MA)

No presente trabalho um dos principais objetivos era identificar os compostos considerados maioritários. Para isso isolaram-se os compostos recorrendo à técnica de HPLC e procedeu-se à identificação recorrendo à espectrometria de massa (MS). Foram identificado 7 picos no extracto aquoso de *V. condensata*, separados por HPLC, os picos maioritário presente no extracto foi identificado, sendo o ácido clorogénico (tr = 8,6 min), e a cinarina (tr = 13,4 min).

Através dos espectros de massa obtido identifica-se as razões massa/carga de maior importância e recorreu-se ao banco de dados de espectrometria de massa MassBank para confirmar os espectros dos compostos.

O pico maioritário do composto com um tempo de retenção de 8,6 min, encontra-se representado na figura 13, e obteve-se o seguinte espectro:

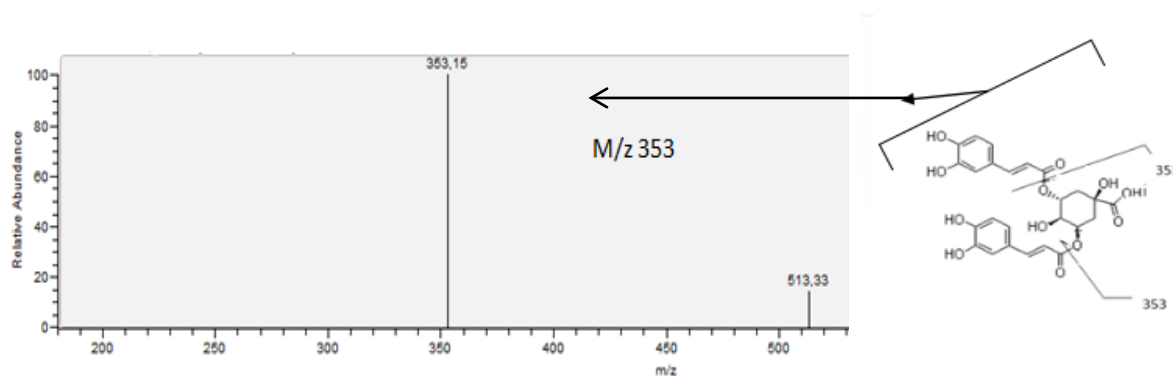


Figura 13- Espectro de massa MS do composto com Tr =8,6 min, obtido em modo negativo, com varrimentos entre os 150 e os 600 Da.

Atribui-se ao espectro de massa obtido o composto ácido clorogénico com fórmula molecular $C_{25}H_{24}O_{12}$ e com razão massa/carga experimental de 353.

Ao composto presente identificado no pico 5 tempo de retenção 13,4 min atribui-se a fórmula molecular $C_{25}H_{24}O_{15}$ correspondente a Cinarina com razão massa/carga experimental de 515, como se pode observar na figura 14.

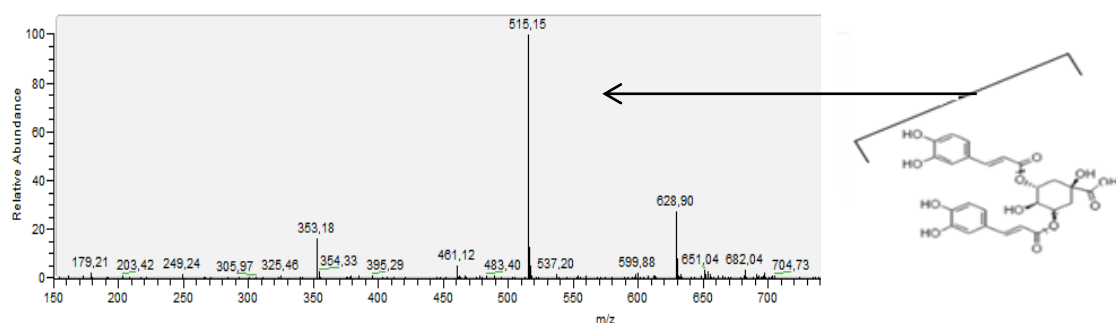


Figura 14- Espectro de massa MS do composto com Tr =13,6 min, obtido em modo negativo, com varrimentos entre os 150 e os 600 Da.

Os compostos identificados como constituintes de *V. condensata* têm vindo a despertar interesse devido às diversas propriedades fundamentais em diversas patologias, destacando-se o seu papel em situações patológicas geradas pelo stress oxidativo como o cancro, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas. Constata-se que os compostos maioritários identificados no extracto – ácido clorgênico e a cinarina são os compostos principal bastante comum na família Asteracea (Abdel-Mogibet et al., 2002).

3.2. Actividade Antioxidante e Actividade Inibitória de Acetilcolinesterase

A AD é uma doença neurodegenerativa à qual está associado um estado de inflamação crónica. Existem estudos que apontam para hipótese de que a elevada produção de moléculas pró-inflamatórias promova a neurodegeneração típica da doença. É essencial encontrar forma de diminuir este estado de inflamação, através de uma terapêutica anti-inflamatória eficaz, por, administração de composto com propriedades antioxidantes.

Assim, analisou-se o extracto aquoso de *V.condensata* para determinar o seu papel como um possível antioxidante natural. Os antioxidantes protegem o organismo da acção dos radicais livres trazendo inúmeras vantagens face ao combate de varias doenças.

A pesquisa científica ligada aos antioxidantes aumentou consideravelmente nos últimos anos, assim como o número de métodos desenvolvidos que permitem medir a sua actividade.

3.2.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante realizada neste trabalho foi determinada através do método DPPH já descrito (2.2.2.1, Capítulo II).

Essa Actividade é determinada através do valor de concentração de extinção (EC_{50}) que corresponde a 50% de extinção de radicais livres DPPH sendo usado como um parâmetro para caracterizar o poder antioxidante do presente extracto.

Determinou-se a % de extinção de DPPH na presença de diferentes concentrações do extracto de *V. Condensata* (30, 20, 10, 5 e 1 $\mu\text{g/mL}$). A representação da percentagem de extinção do radical DPPH em função da concentração de cada concentração permite estabelecer uma regressão linear mostrado na figura 15.

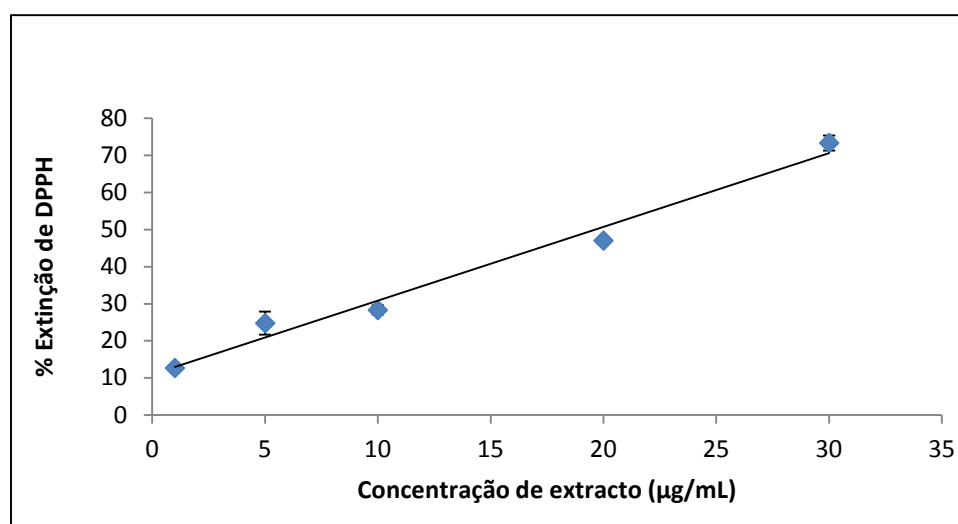


Figura 15. Percentagem de extinção do radical livre DPPH, reflexo da actividade antioxidante, em função de concentração crescente de extracto aquoso de *V. condensata*.

Através da equação obtida ($y = 1,9888x + 10,985$, $r^2 = 0,9978$) é possível determinar um valor de EC_{50} ou seja, o valor para o qual se extingue 50% do radical livre DPPH. O valor de EC_{50} obtido para o extracto de *Vernonia condensata* foi de $20,0 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$, um valor que apresenta devido seus compostos que, de uma forma aparentemente sinérgica, contribuem para esse valor, considerando essa planta ter uma boa atividade antioxidante.

A elevada atividade antioxidante encontrada nesses compostos presente em plantas, tornou-se objetivo de pesquisa, para o desenvolvimento novos antioxidantes naturais, e para outras actividades importantes, o que torna assim o extracto *Vernonia condensata* atrativo para combater o danos oxidativos (Cai et al, 2004;. Djeridane et al, 2006.).

No entanto, existe ainda uma grande percentagem de compostos desconhecidos em extractos de variadas plantas, sendo sua identificação da maior importância, para que, sejam benéfico para o organismo, e possam passar a ser incluídos na dieta alimentar humana (Ferreira & Abreu, 2007).

Para poder tirar conclusão acerca da capacidade antioxidante do extracto aquoso em estudo é necessário compará-lo com valores de EC_{50} determinados para outras espécies e género de plantas, compará-lo também com plantas que possui o mesmo nome usado na medicina popular. Os composto fenólicos estão sendo considerado agentes de proteção, por exemplo o ácido cafeico apresenta um valor de EC_{50} $24,78 \pm 0,19 \mu\text{g}$ considerado ter boa atividade antioxidante. Um estudo realizado por Borneo et al (2009) em quinze espécies da família Asterácea, foi determinado valores de EC_{50} compreendidos entre $198,0 \pm 3,5 \mu\text{g/mL}$ e $2009,7 \pm 84,2 \mu\text{g/mL}$.

Na literatura é possível encontrar exemplos de plantas para qual se determinou o EC_{50} ; Fale et al, (2009) determinou o EC_{50} do extracto aquoso de *Plectranthus barbatus*, com nome popular conhecido no Brasil com “falso boldo”. Fale et al (2012) determinou também o EC_{50} do extracto aquoso de *P. Peumus* uma planta muito utilizada, conhecida como “boldo-do-chile”. Também Fale et al (2013) determinou a extinção do radical DPPH para o extracto aquoso de *C. carduculum* uma planta que pertence a mesma espécie do extracto aquoso em estudo. É para avaliar a actividade antioxidante do extracto aquoso de *V. condensata* comparou-se com o padrão BHT(*buylated hydroxytoluene*), composto orgânico lipofílico utilizado na indústria alimentar como aditivo alimentar antioxidante, e cujo valor de EC_{50} é de acordo (Mata et al 2007), valores de cada citação a cima encontra-se representados na tabela a seguir 5.

Tabela 5- Atividade antioxidante determinada pelo método DPPH. Valores de EC_{50} expressos em $\mu\text{g/mL}$.

Extrato	Atividade antioxidante DPPH ($\mu\text{g/ml}$)
<i>P. boldus</i> ¹	$18,5 \pm 0,1$
<i>P. barbatus</i> ²	$45,8 \pm 0,5$
<i>C. carduculum</i> ³	$123,1 \pm 5,7$
<i>H. italicum</i> ⁴	$14,9 \pm 0,3$
BHT ⁵	$15,7 \pm 0,2$

Falé et al 2012¹ ; Falé et al 2009² ; Falé et al 2013³ ; Tese Ana M⁴ ; Mata et al 2007⁵

Estes valores de EC₅₀ quando comparado com o valor determinado para o extracto aquoso de *V.condensata*, verifica-se uma capacidade antioxidante semelhante considerando para os extratos de *P.boldus* e *H. Italicum* , mas para o extracto *P.barbatus* esse valor mostrou bastante elevado comparado com extracto *V.condensata* , que este apresentou um melhor valor para a actividade antioxidante.

Pelos valores apresentados é possível concluir que o extracto aquoso de *V. condensata* apresenta uma elevada actividade antioxidante. Essa característica do extracto permite justificar a utilização do mesmo, podendo ser utilizado como potencial antioxidante natural em substituição dos antioxidantes sintéticos no combate aos danos provocados pelos agentes oxidantes, podemos que concluir ainda , que a família Asteracea apresenta um grande potencial para desenvolver antioxidantes naturais.

Quando comparado com a capacidade inibitória do padrão , um antioxidante definido pela literatura e utilizada na indústria alimentar o BHT , o seu valor de EC₅₀ referido na tabela a cima, esta da mesma ordem de grandeza da actividade encontrada para o extracto de *V.condesata*, o que torna esse extracto um bom candidato para ser usado com um antioxidante.

3.2.2. Actividade Inibitoria de Acetilcolinesterase

Recentemente, extractos de diversas plantas têm sido objecto de uma série de pesquisas a fim de obter compostos capazes de inibir a AChE. Este grande interesse em encontrar valores aceitáveis presente em exctratos de plantas vem se verificando e constatando que, a maioria das plantas são uma boa fonte de moléculas com esta atividade de inibição (Ingkaninan et al 2003; Mukjerjee et al 2007).

O estudo da inibição da actividade enzimática de acetilcolinesterase (AChE) foi realizada nesse trabalho com o extracto aquoso de *V. condensata* decocção através do método de colorimétrico modificado de Ellman como já descrito(2.2.2.2, Capítulo II) . Este método é baseado na medida da velocidade de produção de tiocolina através da hidrólise do análogo do substrato da AChE, a acetiltiocolina.

Na literatura, a maioria dos estudos de inibição de AChE por plantas medicinais são são efetuados recorrendo a extractos etanólicos e metanólicos, cuja sua actividade inibitória tende a ser superior quando comparada com extractos aquosos (Carpinela, Andrione, Ruiz & Palacios 2010; Vinutha *et al.*, 2007).

Nesse trabalho escolheu-se preparar extracto aquoso, pois a *V. condensata* é tomado, na medicina popular, sob a forma de “cha” decocção, e a preparação deste tipo de extractos permite estudar de forma mais fiável o que acontece *in vivo*.

Hoje em dia, os chás de ervas estão ganhando aceitação popular, pois eles são uma mistura de vários compostos, podendo actuar em diferentes doenças simultaneamente. Esse estudo da atividade de inibição da AChE com extracto aquoso de *V. condensata* foi realizado a fim de encontrar e explicar um pouco do seu tradicional uso e o tão pouco estudo com essa planta.

Especificamente, analisou-se a inibição de AChE por diferentes concentrações (7, 5, 3, e 1 µg/mL) de extracto como o objetivo de determinar o valor de concentração de inibição (IC₅₀), ou seja correspondendo com a concentração de extracto para o qual há inibição de 50% da actividade enzimática, isso permitiu estabelecer uma regressão linear. Na figura 16 apresenta-se o gráfico que traduz a inibição da actividade enzimática, para concentrações crescentes de *V. condensata*

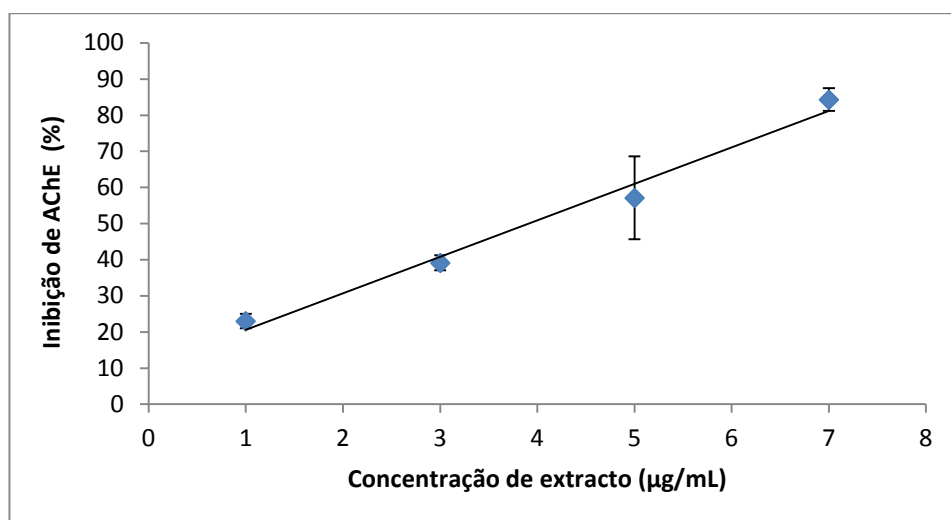


Figura 16- Representação gráfica da inibição da actividade do enzima acetilcolinesterase (%) em função da concentração do extracto aquoso de *V. condensata* preparado por decocção. Ensaio realizado em triplicado.

Através da equação obtida ($y = 10,101x + 10,495$, $r^2 = 0,9839$) é possível determinar um valor de IC₅₀ para o extracto de *V. condensata*. Assim o valor IC₅₀ obtido foi 411 ± 20 µg/mL, sendo esse um valor baixo o que representa um grande potencial para inibir o enzima acetilcolinesterase.

Os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) podem ser usados para aumentar a motilidade gastrointestinal, uma vez que a acetilcolina é o principal neurotransmissor excitatório responsável pela contrações peristálticas (Holzer e Maggi, 1994).

Pode-se inferir assim que extracto aquoso de *V. condensata* preparado sob a forma de decocção apresenta um bom rendimento na extracção de seus compostos, pois foi responsáveis por essa actividade inibitória do enzima AChE, quando comparado com a infusão (resultados não apresentada nesse trabalho), por isso e por seus outros resultados já apresentados nesse trabalho, prossegui com o extracto *V. condensata* decocção.

Na literatura existem vários valores IC_{50} determinados para plantas medicinais, no entanto, como já referido, esses valores são calculados, geralmente recorrendo a extractos metanólicos e/ou etanólicos, o que torna a comparação mais difícil, mas foi possível encontrar na literatura extractos aquoso para fazer essa comparação.(Carpinela, Andrione, Ruiz & Palacios 2010; Vinutha *et al.*, 2007).

Em pesquisas na literatura foi possível encontrar exemplos de plantas medicinais recorrendo a extracto aquoso, para qual se determinou o IC_{50} ; Fale et al, (2009) determinou o IC_{50} do extracto aquoso de *Plectranthus barbatus*, com nome popular conhecido no Brasil com “falso boldo” .Fale et al (2012) determinou também o IC_{50} do extracto aquoso de *Peumus boldus* uma planta muito utilizada, conhecida como “boldo-do-chile”. Também Falé et al (2013) determinou-se o IC_{50} de algumas plantas medicinais conhecidas, como *C. carduculum* planta que pertence a mesma espécie do extracto aquoso em estudo , conhecida pelo nome de alcachofra , e os extractos aquosos de *P. Tridentatumu* uma planta muito utilizada em Portugal e *F. angustifolia* planta que pertence a mesma espécie do extracto aquoso de *V.condensata* . Um estudo com os extractos aquoso de *H.italicum* e *S.impressa* também foi mostrado , onde determinou-se o valor de IC_{50} . Os valores de cada citação a cima encontra-se representados na tabela a seguir 6.

Tabela 6- Atividades inibitória do enzima acetilcolinesterase (AChE). Valores encontrados de IC₅₀ para diferentes extractos aquoso.

Extracto	Actividade inibitória do enzima acetilcolinesterase (AChE)
<i>P. boldus</i> ¹	0, 93±0, 02 mg/mL
<i>P. barbatus</i> ²	31, 4±3, 31 mg/mL
<i>C. carduculum</i> ³	2505 ± 253 µg/mL
<i>H. italicum</i> ⁴	423,52±6,04 µg/mL
<i>S. Impressa</i> ⁵	578,98±13,71µg/mL
<i>P. tridentatum</i> ⁶	1090 ±4,01 µg/mL
<i>F. angustifolia</i> ⁷	1066 ±19 µg/mL

Falé et al 2012¹ ; Falé et al 2009² ;Falé et al 2013^{3,6,7} , Tese Ana M^{4,5}.

Ao observar as referências mostradas na tabela 6 , é possível concluir que o valor de IC₅₀ obtido para o *V. condensata* é bastante inferior ao encontrado para as outras espécies de Boldo , *P. boldus* (0, 93 mg/mL) (Falé et al 2012) e *P. barbatus* (31, 4 mg/mL) Falé et al 2010). A outra planta da mesma família a *C. carduculum* apresentou um valor de IC₅₀ 2505 µg/mL , considerado alto comparado com o extrato em estudo. Já os valores obtidos dos extractos aquosos de *H. Italicum* (423,52 µg/mL) e *S. Impressa* (578,98 µg/mL) são semelhantes e da mesma ordem de grandeza que o obtido para o extracto aquoso de *V. condensata*, o que indica que o extracto em estudo é um bom inibidor de AChE.

A capacidade inibitória de *V. condensata* é maior do que os valores encontrados no nosso grupo para vários outros extratos aquosos, observados na tabela 6.

Para poder tirar conclusões em relação ao poder inibitório de AChE do extracto, comparou-se a capacidade inibitória do padrão de dois dos compostos presente na sua composição do extracto. Os componentes principais encontrados na decocção do extracto *V. condensata* neste estudo, foram descritos na literatura como ativo na inibição da actividade da AChE, o ácido clorogênico com um valor de IC₅₀ de 553,2 ± 22,6 mM (e cinarina com valor de IC₅₀ de 149,9 ± 3,2 uM (Hernandez et al., 2010).

O valor de IC₅₀ dos padrões é bastante inferior ao obtido para o extracto, no entanto é de notar que o extracto aquoso em estudo resultam na mistura de compostos, enquanto os padrão apresenta-se num grau de pureza elevado.

A alta actividade revelada pela *V. condensata* relativamente a *C. cardunculus* deve-se a uma maior concentração de dois ácidos fenólicos presentes na composição dessas duas plantas, o ácido clorogénico e cinarina. Em *C. cardunculus* as quantidades de ácido clorogénico e cinarina são de 147,4 uM e 61,5 uM em 1 mg / mL de solução do extracto, respetivamente (Falé et al, 2013), e no extrato *V. condensata* as concentrações foram de 219 uM para o ácido clorgênico, o que explica 20% da actividade, e contém 61,5 uM de cinarina e outros ácidos dicafeoilquínico o que explica 25% da sua actividade, o restante pode ser atribuídos ao outros ácidos cafeoilquínicos e dicafeoilquínico. A actividade de inibição da AChE do extracto sob avaliação pode, de facto, ser explicado pela presença destes dois ácidos fenólicos.

Finalmente, pode-se concluir que essa alta atividade encontrada para o extracto *Vernonia condensata*, pode contribuir para um melhor processo digestivo relacionado com a melhoria da GID descrito pelas pessoas que consomem esta decocção e permanece inalterado durante o estudo digestivo *in vitro*. Ao inibir o enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina-acetilcolinesterase, *V. condensata* poderá ser assim um possível candidato no alívio de sintomas de doenças a nível do sistema nervoso central.

3.3 Determinação da Citotoxicidade do extrato Aquoso de *V. condensata*

A citotoxicidade do extracto aquoso de *V. condensata*, em células humanas foi avaliado em células Hep-G2, uma linha celular derivada do epitélio do adenocarcinoma cervical e Caco-2, uma linha de células epiteliais do adenocarcinoma colo-rectal, utilizadas para mimetizar o epitélio intestinal. Efetuou-se o ensaio com o intuito de saber a toxicidade/viabilidade celular após a presença do extracto, e que concentração. Sendo esse ensaio importante, pois as plantas medicinais assim como os fármacos são terapêuticos numa dose e tóxicas em outra.

Recorreu-se ao método do calorimétrico MTT como já descrito (2.2.6., Capítulo II) com diferentes concentrações do extracto aquoso *V. condensata*. Os resultados do ensaio com o MTT mostraram que o extracto aquoso diminui em 50% a viabilidade celular das células Hep-G2 e Caco-2 em concentração superior a 0,1 mg / mL, um valor adotado em vários estudos como referência de citotoxicidade para várias linhas celulares (Onsivilai et al., 2008).

Desde modo, foi possível concluir que o extracto de *V. condensata* não é tóxicos para as células Hep-G2 e Caco-2, e assim determinar uma concentração não tóxica de extracto aquoso para prosseguir os estudos com as células, utilizando assim uma concentração inicial de 10mg/mL de extracto aquoso de planta. Os valores de IC₅₀ para o extracto aquoso em estudo encontram-se na Tabela 7.

Outra planta da família Asteraceae, a *C. cardunculus* (alcachofra) também não mostrou qualquer toxicidade para o mesmo tipo de células, sendo uma referência para comparação ,pois seus compostos maioritários identificados assemelhava estruturalmente o extracto *V. condensata* (Falé et al, 2013).

Tabela 7 - Ensaios de citotoxicidade em células HEP-G2 e Caco-2 com seus respectivos valores de IC₅₀.

	Células	IC ₅₀ (µg/mL)
Toxicidade	HEP-G2	586.3±6.5
	Caco-2	580.0±10.0

3.4. Metabolismo *in vitro* do extracto aquoso de *V. condensata*

Ao serem ingeridas, as decocções são sujeitas ao efeito dos sucos digestivos e acção das células localizadas ao longo do tracto gastrointestinal. Com o objectivo de avaliar se o extracto aquoso de *V. condensata* decocção pode sofrer algum tipo de metabolização/degradação com a digestão gastro-intestinal, incubou-se o extracto com o suco gástrico e com suco o pancreático artificial ,segundo o procedimento já descrito em (2.2.5 Capítulo II). A actividade antioxidante e a actividade inibitória à enzima acetilcolinesterase foram avaliadas após as digestões com os sucos.

O extracto de planta foi exposta a condições que simulam o tracto gastrintestinal, nomeadamente a suco gástrico artificial que simula as condições no estômago e no suco pancreático artificial, modelando o intestino delgado.

3.4.1. Digestão do Extracto Aquoso pelo Suco Gástrico Artificial

O suco gástrico é composto pelo enzima pepsina que é produzido pelas paredes do estômago. A digestão do extracto aquoso de *V. condensata* foi realizado em condições ácidas (pH 1), com pepsina simulando o suco gástrico. Prosseguiu-se à análise por HPLC-DAD (figura 17).

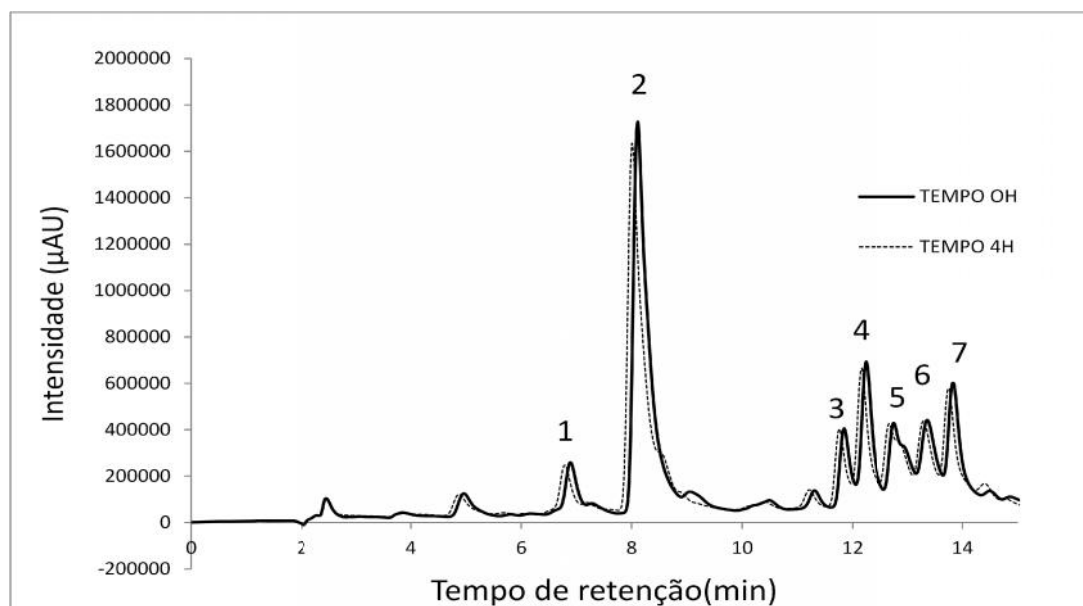


Figura17- Cromatograma do extracto *V. condensata* obtido por HPLC após digestão com suco gástrico.

Ao analisar os dois cromatogramas obtidos acima (figura 17) para as 0 e 4 horas de digestão, é possível concluir que não existe degradação nem formação de novos compostos no extracto, quando em contacto com este suco gástrico, sendo resistente ao pH ácido. Analisando de uma forma mais detalhada os dois cromatogramas, o extracto de *V. condensata* provou ser bastante estável na presença do suco gástrico artificial, sendo necessário determinar as actividades biológicas de maior relevância para assegurar que mantêm semelhante às apresentadas pelo extracto aquoso original.

A influência do suco gástrico artificial nas actividades biológicas do extracto, actividade antioxidante e actividade inibitória de AChE foi avaliada, afim de determinar se o extracto em digestão perdia alguma das suas actividades referidas acima. A determinação das actividades biológicas mais relevantes foi feita recorrendo a concentrações de amostra próximas dos valores obtidos para o de IC_{50} e EC_{50} . Os resultados obtidos para as actividades antioxidante e inibitória de AChE do extracto aquoso em estudo encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8- Actividade antioxidante e actividade inibitória de AChE de *V.condensata* após digestão com suco gástrico artificial.

Actividade após a 4h de digestão (% da actividade inicial)		
Horas	DPPH (%)	AChE (%)
0	100±0.86	100 ±4.7
1	99.6 ±1.8	83.6± 7.5
2	96.4 ±0.86	89.9± 2.5
3	95.8 ±3.05	81.84 ± 4.4
4	95.5 ±1.35	84.0 ±6.4

Ao observar a tabela a cima, é possível concluir que , durante a digestão pelo suco gástrico , não há perda de actividade inibitória de AChE e actividade antioxidante por parte do extracto aquoso de *V. condensata* , após as 4 horas de incubação, sendo as % de extinção do radical DPPH e inibição de AChE praticamente estáveis ao longo desse período. Isto é extremamente importante pois o objetivo final é que o extracto mantenha estas propriedades intactas, para assim aumentar as probabilidade de absorção do mesmo, entrada na corrente sanguínea e transporte para tecidos-alvo onde as actividades biológicas possam ser relevantes.

Tendo em conta os perfis cromatográficos obtidos para as 0 e 4 horas apresentados em cima , são perfeitamente coincidentes , assim os resultados obtidos para as actividades ,estão de acordo com o esperado, uma vez que se mantiveram praticamente inalterados ao longo das 4 horas de incubação com suco gástrico artificial.

3.4.2 Digestão do Extracto Aquoso pelo Suco Pancreático Artificial

O suco pancreático é um líquido secretado pelo pâncreas que é constituído por um conjunto de enzimas, incluindo amílase, lípase,ribonucleases, protéase e tripsina. Ao contrário do suco gástrico, o suco pancreático é de natureza alcalina devido à elevada concentração de iões bicarbonato. Assim a digestão do extracto aquoso de *V. condensata* foi realizado em condições básicas (pH 8), simulando as condições geralmente encontrada no intestino delgado. Prosseguiu-se à análise por HPLC-DAD.(Figura 18)

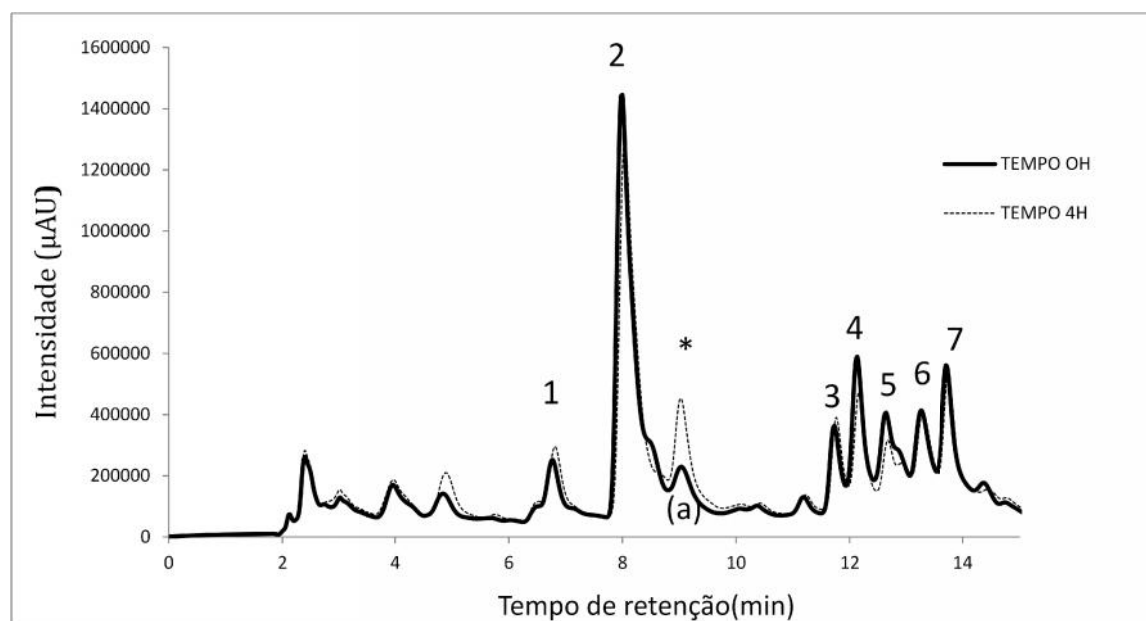


Figura 18- Cromatograma do extracto aquoso de *V. condensata* decocção obtido por HPLC após digestão com suco pancreático artificial.

Ao analisar os dois cromatogramas obtidos acima (figura 18) para as 0 e 4 horas de digestão, é possível concluir que não existe degradação significativa, nem formação de novos compostos no extracto, quando em contacto com este suco pancreático.

Analisando de uma forma mais detalhada os dois cromatogramas, o extracto de *V. condensata* provou ser bastante estável na presença do suco gástrico artificial. É possível notar um aparecimento de pico (a) tempo retenção de 9 min, esse pico deve à pancreatina um constituinte do suco pancreático, sendo esse confirmado quando comparado com o cromatograma obtido para o branco do suco pancreático, contudo é necessário determinar as actividades biológicas de maior relevância para assegurar que mantêm semelhante às apresentadas pelo extracto aquoso original.

A determinação das actividades biológicas mais relevantes foi feita recorrendo a concentrações de amostra próximas dos valores obtidos para o de IC_{50} e EC_{50} .

Os resultados obtidos para as actividades antioxidante e inibitória de AChE do extracto aquoso em estudo encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9- Actividade antioxidante e actividade inibitória AChE do *V.condensata* após digestão com suco pancreático.

Actividade após 4 h de digestão (% da actividade inicial)		
Horas	DPPH (%)	AChE (%)
0	100 ± 4.8	100 ± 2.8
1	105± 3.0	83.3 ± 1.3
2	113.4± 3.1	101 ± 1.8
3	97.74 ±1.0	96 ± 1.7
4	95.5 ±1.35	74 ± 1.2

Ao observar a tabela a cima, é possível concluir que ao incubar o extracto aquoso de *V. condensata* com suco pancreático, este não provoca alterações significativas na actividade antioxidante, mais sim na actividade inibitória ao enzima acetilcolinesterase após as 4 horas de incubação. Sendo assim verificou-se o motivo da variação das percentagens de inibição de AChE ao longo desse período de 4 horas.

Podemos observar nos resultados mostrado a cima, que a extinção do DPPH estava de acordo com o esperado, uma vez que os cromatograma obtido por HPLC se manteve praticamente inalterados ao longo das 4 horas de incubação com suco pancreático artificial. Isso justifica os resultado da extinção do DPPH , o que não poderia justificar as variações nas percentagem da inibição da AChE , pois o cromatograma obtido por HPLC também se manteve praticamente inalterados ao longo das 4 horas de incubação com suco pancreático artificial.

Após as 4 horas de incubação viu-se no fundo do tubo de Eppendorf utilizado para o estudo da digestão pancreática, após a centrifugação, um sedimentado verde-escuro, sendo uma cor característica do extracto *V. condensata* (compostos fenólicos), assim conclui que poderia estar relacionado a pancreatina com os compostos do extracto. Podemos observar na figura 19.

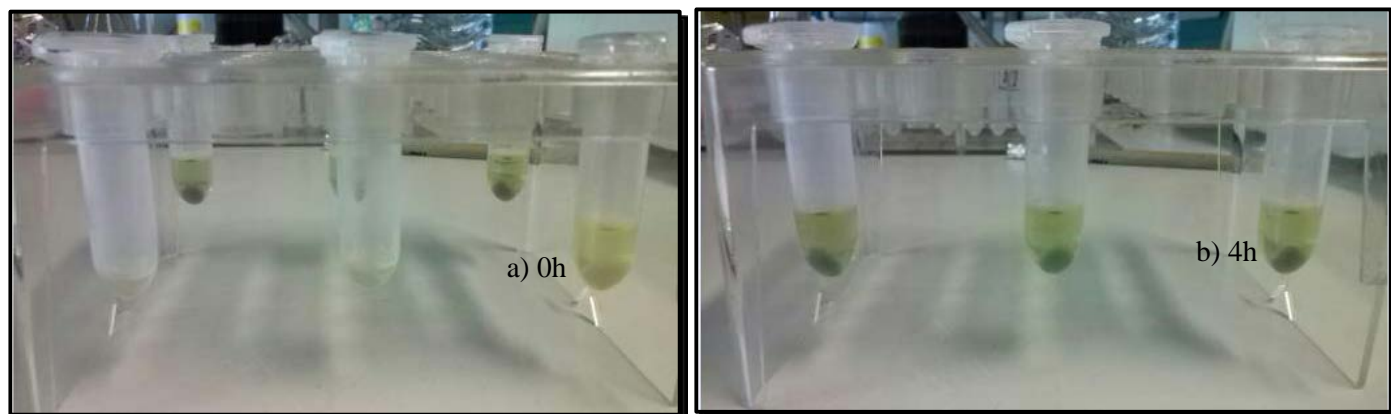


Figura 19. Sedimentado no fundo do tubo de Eppendorf após 4 horas de incubação do extracto *V. condensata* com o suco pancreático.

Desde então presume-se que poderia ter compostos presentes do extracto retidos nesse sedimentado que era característico da pancreatina. Deste precipitado dilui-se com metanol e voltou a injetar no HPLC e assim prosseguiu-se à análise por HPLC (figura 20).

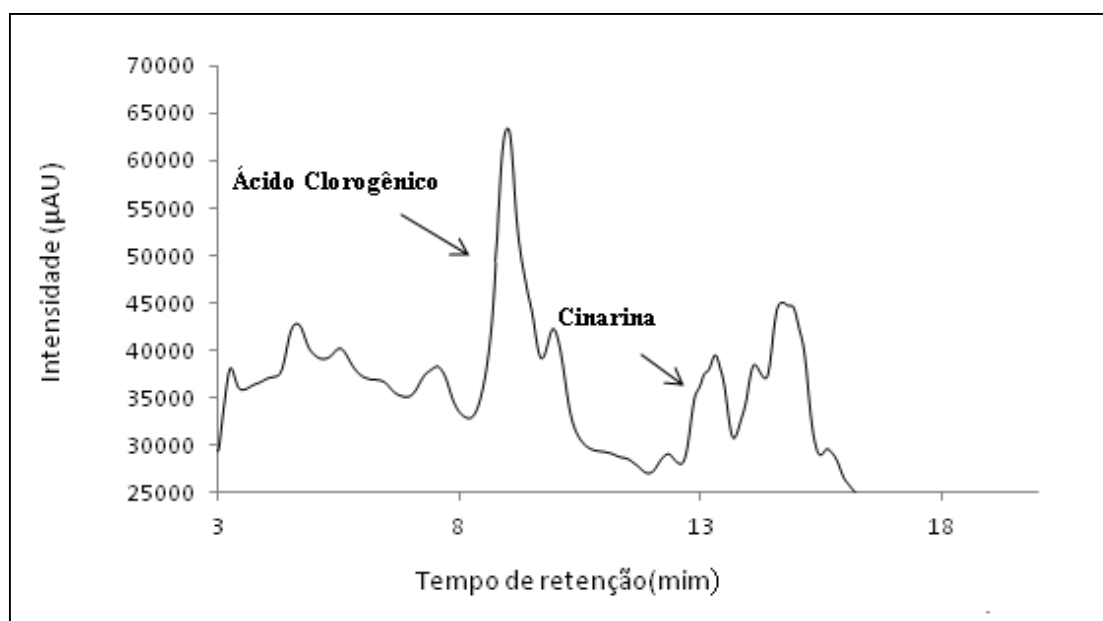


Figura 20. Cromatograma da confirmação do sedimentado retido no fundo do tubo de Eppendorf obtido por HPLC (T= 4 horas de digestão pancreática artificial).

Ao analisar o cromatograma a cima, podemos verificar e confirmar que existem compostos do extracto aquoso de *V. condensata*, sendo os principais identificados no extracto, o ácido clorogénico e cinarina. Após as 4 horas de incubação com o suco pancreático, deu origem a

esse sedimentado, formado por proteínas presentes no suco pancreático e que consequentemente capturou os compostos do extracto, explicado e justificando as variações/diminuição das percentagens da actividade inibitória de AChE.

Para confirmar a existência de actividade desse sedimento foi avaliada a actividade inibitória de AChE. O resultado obtido para a actividades inibitória de AChE encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10- Actividade inibitória de AChE do extracto aquoso *V.condensata* após digestão com suco pancreático.

Actividade da 4h de digestão (% da actividade inicial)	
Horas	AChE (%)
0	100 ± 4.8
4	71± 5.0

Ao observar a tabela a cima da actividade inibitória de AChE , consta que o retido verde-escuro no fundo do tubo de Eppendorf possui uma actividade inibitória de AChE significativa, o que podemos concluir que as variações dos resultados mostrado na tabela a cima torna-se um ponto esclarecido e testado.

O estudo da digestão com o suco pancreático artificial mostrou que não existem alterações significativas na actividade antioxidante e na actividade inibitória ao enzima acetilcolinesterase ao fim das 4 horas de incubação, tendo em conta que não houve alterações nos perfis cromatográficos obtidos para as 0 e 4 horas apresentados a cima.

Este resultado foi confirmado por uma análise realizada no HPLC ,que indica que a não verificou qualquer tipo de alteração química na composição do extracto, sendo o extracto bastante estável na presença dos sucos gástricos e pancreático durante o tempo de ensaio.Mais uma vez, o cromatograma inicial e das 4 horas de digestão estavam completamente sobreposto, o que confirma esta estabilidade.

Estudos na literatura indicam que outros “boldos” como *P. Boldo* e o *P. Barbatus* são indicados para digestão e a diminuição do colesterol, e são estáveis no que diz respeito aos compostos fenólicos sob condições gastrointestinais (Bouayed et al., 2012; Porfirio et al

2010). Outra planta encontrada é a *Cynara Cardunculus* (Asteracea) que demonstra essa estabilidade sobre as mesmas condições gastrointestinais. (Falé et al 2013).

Os flavonoides presente nesse extracto, mantiveram-se estáveis sob condições gástrica e pancreática. Os principais compostos dessa planta em condições pancreáticas , foi realizados em outros estudo na literaruta , verificando que a sua estabilidade pode variar 41-71% (Bouayed et al., 2012) ou em 31 a 91% (Gumienna et al., 2011).

Finalmente podemos concluir que os resultados obtidos indicam que o extracto de *Vernonia condensata* pode ser usado para o estudo da influência sobre a absorção do colesterol ou da inibição da atividade da HMG-CoA, pois tem a possibilidade de alcançar as pequenas células do intestino, sem qualquer modificação na química estrutura dos seus componentes.

3.5. Inibição da actividade da HMG-CoA pelo extracto aquoso *V. condensata* decocção

Uma abordagem para diminuir o nível de colesterol consiste na inibição da actividade enzimática da HMG-CoA redutase. Sendo um dos objetivos desse trabalho em estudar o efeito do extracto como um inibidor dessa enzima. Os resultados obtidos anteriormente indica que o extracto de *V. condensata* pode ser usado para o estudo da influência sobre a absorção do colesterol ou da inibição da atividade da HMG-CoA, pois tem a possibilidade de alcançar as pequenas células do intestino, sem qualquer modificação na química estrutura dos seus compostos.

Os principais componentes, do extracto, ácido clorogênico e a cinarina foram identificado em diversos estudos, em diferentes extractos, encontrando valores elevados para inibição da actividade enzimática, mas embora com menor potência comparativamente ao fármaco sinvastatina. Esses dois compostos têm uma elevada capacidade de inibição para esta enzima, sugerindo que eles podem causar um redução colesterol no sangue de forma semelhante à ação do drogas "estatinas"(Fale et al 2014). A sinvastatina e outros ja citados(1.3.2 capitulo II), são farmacos utilizados e possui uma actividade muito mais elevada do que extractos aquoso de plantas, mas mesmo sendo medicamentos eficazes não deixam de ser drogas cercadas de riscos, alguns até fatais,por esta razão estes medicamentos só devem ser tomados sob orientação e acompanhamento de um médico.

Existem relatos na literatura indicando a capacidade elevada de inibição da *C. cardunculus* (alcachofra) para inibir a HMG-CoA redutase (Fritsche et al .,2002 e Fale et al 2014), sendo seus compostos iguais aquelas encontrados no presente trabalho.

Essa actividade esta relacionada principalmente ao ácido clorogênico e cinarina, que também é um inibidor da enzima. O IC₅₀ dos padrões juntamente com o extracto *C. cardunculus* (alcachofra) são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Os valores de IC 50 para a inibição de HMG-CoA redutase.

Extracto Aquoso	Inibição HMG-CoA
<i>C. cardunculus</i> *	IC ₅₀ = 152.66 ±15.99 µg/mL
Acido Chlorogenico*	IC ₅₀ = 12.90±0.51 µM
Cinarina*	IC ₅₀ = 9.06±0.39 µM
Sinvastatina*	IC ₅₀ = 198±0,015 µg/mL

*Fale et al 2013

Ao observar as referências mostradas na tabela 11 , é possível concluir que a o valor de IC₅₀ obtido para o *V.condensata* indica que o extracto de *V. Condensata* pode inibir a atividade da HMG-CoA redutase, com um o valor de IC₅₀ 217.7 µg / mL.

Os principais compostos presentes no extracto: ácido clorogênico e cinarina indicam que essa capacidade de inibição da HMGR esta relacionada com esses compostos.

Para poder tirar conclusões em relação ao poder inibição da atividade da HMG-CoA redutase do extracto, comparou-se a capacidade inibitória do padrão de dois (ácido clorogênico e cinarina) dos compostos presente na sua composição do extracto. Os compostos referidos pode permear a barreira intestinal (de acordo com a biodisponibilidade células Caco-2) e pode explicar os resultados encontrados com as pessoas que tomam esta decoção. Esses dois compostos têm uma elevada capacidade de inibição para esta enzima, sugerindo que eles podem causar um redução colesterol.

Os componentes principais encontrados na decoção do extracto *V. condensata* neste estudo, foram descritos na literatura como ativo na inibição da actividade da AChE, como o ácido clorogênico com um valor de IC₅₀ de 12,9± 0,51 µM e cinarina com valor de IC₅₀ de 9,06 ± 0,39 µM (Hernandez et al., 2010). O valor de IC₅₀ dos padrões é bastante inferior ao obtido para o extracto, no ,entanto é de notar que o extracto aquoso em estudo resultam na mistura de compostos, enquanto os padrão apresenta-se num grau de pureza elevado.

O extracto contém 7,8 µg de ácido clorogênico e 3,18 µg de cinarina em 1mg de extracto e, cada um , separadamente justifica 34% da actividade ao ácido clorgênico e o restante pode ser atribuída a cinarina 14%, obtidos no extracto de *V. condensata*. O que explica

48% da atividade relacionada com a capacidade de inibição para essa enzima (HMG-CoA redutase), sugerindo causar uma redução no colesterol no sangue. Este efeito foi também detectada em em outro extracto aquoso como *C. carduculum* (tabela 8) que é conhecido como um inibidor da HMGR (Falé et al 2014; Valentão et al 2004).

A inibição da HMGRCoA redutase pelo extracto com um valor de 48% , está proximo a alguns chás ja utilizados para redução do colesterol com o chá preto, que apresenta um valor de 43% com 100 mg / mL, sendo ele maior do que o relatado para o chá verde, de 34% com 100 mg / mL (Singh et al., 2009). Na verdade o chá preto (Davies et ai., 2003), bem como o chá verde (Zheng et al., 2011) causou uma redução no colesterol de pessoas que consomem várias porções por dia.

3.6. Estudo da permeação do colesterol com extracto aquoso *V. condensata* decocção

Após o estudo da digestão nos sucos gástrico e pancreático, é necessário perceber se os compostos são metabolizados e/ou absorvidos pelas células intestinais. Este tipo de estudo é um passo importante na pré-formulação de novos fármacos.

A linha celular humana Caco-2 tem sido utilizada extensivamente ao longo dos ultimos 20 anos como modelo in vitro da barreira instestinal. A linha celular parental, originalmente obtida de um adenocarcinoma colorrectal, sofre um processo de diferenciação espontânea, quando em cultura, promovendo formação de monocamadas celulares, que apresentam diversas características morfológicas e funcionais típicas de enterócitos maduros.

O modelo celular Caco-2 são geralmente usada para determinar a absorção de fármacos em estudos e os mecanismo de transporte e metabolismo de fármacos e de produtos naturais. A FDA reconheceu este modelo como adequado para determinar a classificação de um composto de acordo com o seu perfil de absorção e sua integração no *Biopharmaceutics Classification System*.

No presente trabalho, tal como já apresentado em 2.2.7 (Capitulo II), as células são colocadas a crescer membranas microporosas em divisões com duas câmaras *Transwell*, que formam um compartimento apical onde foi colocados 500 µl de suspensão celular em meio e um compartimento baso-lateral que coloca-se meio HBSS.

Essas células diferenciam-se monocamada muito semelhante ao da barreira intestinal e expressa os transportadores de membrana responsáveis para a permeação do colesterol, tais como NPC1L1 (Sané et al., 2006). A redução da hipercolesterolemia humano é realizada pelo

dois processos principais, a inibição da absorção no intestino de nível, usando ezetimiba que compete com o colesterol para o transportador proteína (NPC1L1) (Ge et al. de 2008), ou a inibição da via biossintética do colesterol utilizando inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMG-CoA redutase),tais como as estatinas .

O estudo do transporte através da membrana é efetuado das células do compartimento apical para o compartimento baso-lateral. A biodisponibilidade do colesterol foi medido após a análise da composição dos compartimentos apical, baso-lateral e intracelular.

Muitos trabalhos encontrados na literatura para o estudo do efeito de extractos sobre a biodisponibilidade do colesterol, foi realizado apenas com o extracto em contacto com as células durante um período de 6 horas. Neste ensaio, além das 6 horas do extracto em contacto com as células, fez-se outro ensaio que deixou o extracto em contacto com as células num periodo de 24 horas, e após esse período foi adicionado o colesterol com o meio HBSS e deixando assim o colesterol e o extrato em contacto com as células num período de 6 horas. Após 6 h em contacto com células Caco-2, a quantificação do colesterol no compartimento apical, basolateral e no interior das células foi analisada e encontra-se na Tabela 12.

Tabela 12. Biodisponibilidade do colesterol na presença do extracto *Vernonia condensata*

	Permeação do Colesterol	
	Intracelular	Baso-lateral
Controle	35,1 ± 7,2	21,4 ± 3,1
Boldo 6h	10,4 ± 1,4	23,8 ± 0,5
Boldo 24h	4,4 ± 3,2	13,2 ± 8,6
Ezetimiba 100 µM	18,9 ± 1,9	5,2 ± 3,1

Observando a Tabela 12, verifica-se que a quantidade de colesterol diminui no interior das células quando o boldo está em contacto com as células, quer 6 quer 24h. No primeiro caso verifica-se uma diminuição de cerca de 70%. Quando o boldo esteve 24h em contacto com as células podemos observar que houve uma redução de 38% do lado basolateral e 87% no interior das células.

Comparando com a ezetimiba o fármaco usado, de forma com a mesma finalidade, redução na absorção do colesterol (Altmann et al, 2004; Geat et al., 2008), verifica-se que na concentração 100 µM, o decréscimo para o lado basal foi mais elevado.

O fármaco ezetimiba é um composto puro, isto explica o seu resultado em comparação com extracto em estudo, que este apresenta na sua composição uma mistura com vários compostos fenólico, e o resultado dessa mistura é um completo processo de regulação dos transportadores de membrana, sendo diferente comparativamente para a permeação de um composto isolado ezetimiba (Falé et al.2013).

Pode ser visto também que os compostos fenólico presentes na decoção dos extractos tenham uma competição com os transportadores de influxo ou com a inibição das proteínas transportadoras de membrana que podem alcançam o compartimento intracelular de forma diferentes.

Vários estudos também têm demonstrado que extratos ricos em flavonóides diminuir o colesterol plasmático em ratos com dieta rica em colesterol, independentemente de afetar o metabolismo do colesterol (Kim et al., 2013).

Os resultados aqui obtidos sugerem que o extracto pode interferir com os transportadores de colesterol presentes no lado apical das células intestinais, tais como o NPC1L1 quer por bloqueamento do sistema transportador, quer por diminuição da expressão desta proteína, resultando na diminuição de transporte do colesterol para o lado basal das células. Verificou-se que no ensaio do extracto em contacto com as células no período de 24 horas obteve-se os maiores valores (percentuais) encontrados comparativamente a 6 h. Podemos concluir com este ensaio, que o extracto em contacto as células a mais tempo, faz com que o haja uma interação maior com os transportadores presentes nas células.

3.7. Permeação do extracto aquoso *V. condensata* nas células Caco-2

A fim de saber como os compostos presentes no extracto aquoso boldo decoção poderia contribuir para a redução colesterol, o extracto *V. condensata* foi colocado em contacto com as células Caco-2 para estudos de biodisponibilidade dos compostos.

A biodisponibilidade dos compostos presentes no extracto foi confirmada após uma análise da composição do compartimento basolateral e no interior das células. Os ácidos fenólicos que estavam presentes no extracto, o ácido clorogênico e cinarina, são esses os mais importantes e também alvo de análise durante os estudos de permeação. A permeabilidade dos compostos foi expressa em percentagem do composto de que permeol o lado apical para o compartimento baso-lateral da *Transwell*, como se mostra na Tabela 13.

Tabela 13. Biodisponibilidade dos principais compostos do extracto aquoso decoção *V. condensata* através de monocamadas Caco-2.

Extrato	Pico HPLC	Permeação	
		Basolateral (%)	Intracelular (%)
<i>V. condensata</i>	Ácido clorogênico	26,7±3,0	13,0 ±0,2
	Cinarina	15,8±6,1	12,0±1,1

O composto presente no extracto o luteoline/canferol (tempo de retenção 14.0) não foi detectado no compartimento baso-lateral nem no interior das células Caco-2. No que respeita à permeação dos componentes do extracto, é importante notar que os extratos têm quantidades diferentes de cada composto, a permeabilidade do ácido clorogénico é muito mais elevada do que a cinarina, diferença estatisticamente significativa com 95% de confiança. Ao observar a tabela a cima a quantidade de ácido clorogénico no lado basolateral após 6 h é de 26,7% e de cinarina 15,8%, esse resultado é justificado pela maior quantidade de ácido clorogénico presente no extracto. Ele mostrou ser capaz de permear a barreira intestinal mais que os outros compostos. Através destes resultados podemos concluir que os compostos do extracto podem de facto permear o intestino e atingir o fígado para atuar sobre o a actividade da HMG-CoA redutase. Noutros trabalhos (Falé et al., 2012b) verificou-se que este tipo de compostos circula na corrente sanguínea, ligado às proteínas do soro, podendo portanto atingir os órgãos alvo.

O acido clorogénico identificado no extracto *C.cardunculus*, uma planta da familia asteracea, obteve um valor semelhante ao extracto em estudo, onde há permeação do ácido clorogénico parece ser muito elevada, aproximadamente 18,18%, coerente com resultado que mostram que a permeações deste composto nos extractos pode variar 0,28-28% (Falé et al., 2013b) Para entender melhor foi realizado estudos que apresenta a permeação do composto puro, levando assim a maiores valores de ácido clorogénico no lado basolateral das células do que o obtido com os extractos que apresenta valores mais baixos comparativamente com experiência realizada com o padrão. Isto indica que deve haver interferências entre os flavonóides e os derivados (Falé et al., 2013a).

Capítulo IV – Conclusões e Perspectivas Futuras



1. Conclusões

O extracto aquoso de *Vernonia condensata* preparado sobre a forma de “cha” demonstrou ser um potencial antioxidante natural devido sua alta atividade apresentando um valor EC_{50} decocção de $20,0 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ e também como um potencial inibidor do enzima AChE com um valor de IC_{50} decocção de $400 \pm 20 \mu\text{g/mL}$ e uma atividade de inibição da HMG-CoA redutase com um valor de IC_{50} decocção de $272 \pm 20 \mu\text{g/mL}$ sendo esses valores positivos, poderão ser responsáveis pelos os efeitos terapêuticos sentidos pelas pessoas que bebem a decocção, explicando assim, em parte, o seu uso tradicional diminuir problemas gastrointestinais e hipercolesterolemia.

Os principais compostos que foram identificados e quantificados (HPLC e por espectrometria de massa) deste extrato são os ácidos monocateoilquínicos (tais como ácido clorogénico) e dicafeoilquínicos (como cinarina) sendo estes os responsáveis pelas atividades de todo o extrato. Prosseguiu-se assim para o estudo de citotoxicidade em linhas celulares humanas, onde constatou-se que o extracto aquoso de *Vernonia condensata* não apresentava toxicidade para as células Caco-2 e Hep-G2 (IC_{50} de $0,58 \pm 0,06 \text{ mg / ml}$ e IC_{50} de $0,58 \pm 0,01 \text{ mg / ml}$) respectivamente.

O estudo do metabolismo *in vitro* do extracto através do tracto digestivo, estudado por acção dos sucos gástrico e pancreático artificiais, sugeriram que não houve alterações significativas a nível da composição química e a nível das actividades biológicas.

O estudo da biodisponibilidade dos compostos do extracto aquoso, permitiu verificar, que os compostos como o ácido clorogénico e a cinarina conseguem permear a membrana das células Caco-2, sendo a permeação para o ácido clorogénico superior. Estes resultados sugerem que este ácido poderá ter entrado via paracelular e através do transportador MCT, tal como descrito na literatura para o ácido cafeico. Ao observar o estudo da permeação do colesterol verifica-se que o extracto *V.condensata* é um potente candidato para redução do colesterol no sangue.

No final deste trabalho, pode-se concluir que o “chá” obtido a partir de *V.condensata* pode ser utilizado como potencial antioxidante, inibidor da actividade do enzima acetilcolinesterase e como um possível redutor do colesterol.

2. Perspectivas Futuras

Os resultados apresentados nesta dissertação permitem propor a continuação deste estudo. Deste modo considera-se importante:

- Realizar estudos com diferentes concentrações para a permeabilidade do colesterol , e assim estudar o efeito do extracto com varias concentrações até o valor máximo de toxicidade.
- Estudar que transportadores celulares são responsáveis pela biodisponibilidade dos compostos presentes no extracto.
- Estudar simultaneamente a ação do fármaco ezetimiba e o extracto nas Caco-2 , onde estejam em contacto num período de 24 horas.
- Prosseguir o estudo com a infusão para assim comparar com os estudo adquiridos nessa dissertação: Inibição de acetilcolinesterase, atividade antioxidante, HMG-CoA redutase e biodisponibilidade de colesterol.

Capítulo V – Bibliografía

- Adedeji, O. & Jewoola, O. A. (2008). *Importance of leaf epidermal characters in the Asteraceae family*. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 36, 7-16.
- Agra MF, França PF, Barbosa-Filho JM 2007. *Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil*. Rev Bras Farmacogn 17: 114-140.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O. & Hamzaoglu, E. (2010). *Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of Helichrysum (Asteraceae) species collected from Turkey*. Food Chemistry, 119, 114-122.
- Al-Ismaïl, K. M., Aburjai, T. (2004). *Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds*. Journal of the Science of Food and Agricultural, 84, 173-178.
- and temperate herbal teas. Journal of Food Composition and Analysis, 23, 185-189.
- Anderson, L. C. & Creech, J. B. (1975). *Comparative leaf anatomy of Solidago and related Asteraceae*. American Journal of Botany, 62, 486-493.
- Anjo, D. F. C. (2004). *Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular – Artigo de Revisão*. JornalVascularBrasileiro,3(2),145-154.
- Bachurin, S. O. (2003). *Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease*. Medicinal Research Reviews, 23, 48-88.
- Barbosa, M.C.S., Belletti, K.M. da S., Corrêa, T.F., Santos C.A. de M. (2001). *Avaliação da qualidade de folhas de boldo-do-chile (Peumus boldus Molina) comercializados em Curitiba, PR*. Revista Brasileira de Farmacognosia, 11 (1): 1-4.
- Bremer, K. (1994). *Asteraceae: cladistics and classification*. Timber Press, Portland.
- Cervellati, R., Renzulli, C., Guerra, M. C., Speroni, E. (2002). *Evaluation of Antioxidant Activity of Some Natural Polyphenolic Compounds Using the Briggs-Rauscher Reaction Method*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 7504-7509.
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., Chong, K. L., Tan, J. B. L., Wong, S. K. (2010). *Antioxidant properties of tropical*
- Cláudio V. J; Bolzani I S V; Maysa F; Carlos A. M. F. ; Eliezer J. B. (2004). *Natural products as candidates for useful drugs in the treatment of Alzheimer's disease*. Quím. Nova vol.27 no.4 São Paulo.
- Davis, K. A. M., Masella, J. & Blennerhassett (1998). *Acetylcholine metabolism in the inflamed rat intestine*. Experimental Neurology, 152, 251-258.
- Doll U., Ortiz D.A., Carrera P.L. (2005). *Caracterización morfológica de tres procedencias de boldo (Peumus boldus) en una plantación joven de 6 años*. Bosque, 26(3): 45-54.
- e estresse oxidativo. Revista da Associação Médica Brasileira, 43(1), 61-68.
- Falé, P.L., Ascensão, L., Serralheiro, M.L., 2013. *Effect of luteolin and apigenin on rosmarinic acid bioavailability in Caco-2 cell monolayers*. Food and Function 26, 426–431.
- Falé, P.L.V., Ascensão, P., Serralheiro, M.L.M., Haris, P.I. (2012b). *Interaction between Plectranthus barbatus herbal teas components and acetylcholinesterase: binding and activity studies*. Food and Function, 3, 1176-1184.
- Ferreira, A. L. A., Matsubara, L. S. (1997). *Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa*
- Ferreira, I. C. F. R., Abreu, R. M. V. (2007). *Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos*. Bioanálise, IV(2), 32-39.

- Figueiredo, N.L., Aguiar, S.R.M.M., Falé, P.L., Ascensão, L., Serralheiro, M.L.M., Lino, A.R.L.(2010). *The inhibitory effect of Plectranthus barbatus and Plectranthus ecklonii leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of Streptococcus sobrinus and Streptococcus mutans*. Food Chemistry, 119: 664–668.
- Fritsche J, Beindorff CM, Dachtler M, Zhang H, Lammers JG (2002). *Isolation, characterization and determination of minor artichoke (Cynara scolymus L.) leaf extract compounds*. Eur. Food Res.Technol. 215:149–157.
- Ge, L., Wang, J., Qi, W., Miao, H.H., Cao, J., Qu, Y.X., Li, B.L., Song, B.L. (2008). *The Cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterol-induced internalization of NPC1L1*. Cell Metabolism, 7: 508-519
- Gião, M. S., Gomes, S., Madureira, A. R., Faria, A., Pestana, D., Calhau, C., Pintado, M. E., Azevedo, I., Malcata, F. X. (2012). *Effect of in vitro digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of Agrimonia eupatoria, Rubus idaeus, Salvia sp. and Satureja montana*. Food Chemistry, 131, 761-767.
- Giori, F. P. (2010). *Adaptação de metodologia de digestão in vitro e determinação da bioacessibilidade in vitro de β -caroteno em três variedades de batata doce de polpa alaranjada*. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, disponível em www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=181869, acessado em Agosto de 2012.
- Gold, P. E.; Cahill, L.; Wenk, G.L.; (2002). *Ginkgo Biloba : A Cognitive Enhancer* Psych. Sci. Publ. Int. 3, 2.
- Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, M.C.W., et al. (2002). *A systematic screening of total antioxidants in dietary plants*. Journal of Nutrition, 132, 461–471
- Henning, S. M., Fajardo-Lira, C., Lee, H. W., Youssefian, A. A., Go, V. L. W., Heber, D. (2003). *Catechin Content of 18 Teas and a Green Tea Extract Supplement Correlates With the Antioxidant Capacity*. Nutrition and Cancer, 45(2), 226-235.
- Henning, S. M., Fajardo-Lira, C., Lee, H. W., Youssefian, A. A., Go, V. L. W., Heber, D. (2003). *Catechin Content of 18 Teas and a Green Tea Extract Supplement Correlates With the Antioxidant Capacity*. Nutrition and Cancer, 45(2), 226-235
- Hernandez, M.F., Falé, P.L.V., Araújo, M.E.M., Serralheiro, M.L.M. (2010). *Acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of the water extracts of several Hypericum species*. Food Chemistry, 120 (4): 1076-1082.
- Holzer, P. & Maggi, C. A. (1994). *Synergistic role of muscarinic acetylcholine and tachykinin NK-2 receptors in intestinal peristalsis*. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 349, 194-201.
- Istvan ES, Deisenhofer J (2001). *Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase*. Sci. 292:1160-1164.
- K. Hostettmann, E. F. Queiroz, P. C. Vieira, *A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores*. Série de textos da Escola de Verão em Química IV, São Carlos, SP, EdUFSCar, 2003, 152 p.
- Konishi, Y. & Kobayashi, S. (2004b). *Microbial metabolites of ingested caffeic acid are absorbed by the monocarboxylic acid transporter (MCT) in intestinal Caco-2 cell monolayers*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 6418-6424.

- Lamarão, R. C., Fialho, E. (2009). *Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal*. Revista de Nutrição, 22(2),257-269.
- Lidon, F., Silvestre, M. M. (2010). *Princípios de Alimentação e Nutrição Humana*. 1ª Edição, Escolar Editora, Lisboa, Portugal, pp. 307-323, 528-529, 532.
- Lietava, J. (1992). *Medicinal plants in a Middle Paleolithic grave Shanidar IV*. Journal of Ethnopharmacology, 35, 263-266.
- Lukhoba, C.W., Simmonds, M.S.J., Paton, A.J. (2006). *Plectranthus: A review of ethnobotanical uses*. Journal of Ethnopharmacology, 103: 1–24.
- M. C. Silva, J. C. T. Carvalho,(2004). *Plantas Medicinais: Antiinflamatórios , Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*.Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, 480 p.
- Mata A.T., Proença C., Ferreira A.R., Serralheiro M.L.M., Nogueira J.M.F., Araújo M.E.M.(2007). *Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices*. Elsevier Food Chemistry, 103: 778–786.
- Michaelis ML. *Drugs targeting Alzheimer's disease: some things old and some things new*. J Pharmacol Exp Ther. 2003;304:897–904
- P.L. Falé,F. Amaral, P.J. Amorim Madeira, M. Sousa Silva, M.H. Florêncio,M.L.M. Serralheiro,F.N. Frazão.(2012a). *Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of Peumus boldus water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines*. Food and Chemical Toxicology.
- Paleari, L., Grozio, A., Cesario, A. & Russo, P. (2008). *The cholinergic system and cancer*. Seminars in Cancer Biology, 18, 211-217.
- Palombo, E. A. (2009). *Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2011, 1-15.
- Pedro L. Falé Catarina Ferreira,, Federica Maruzzella , Maria Helena Florêncio ,Fátima N. Frazão , Maria L.M. Serralheiro , (2013).*Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of Annona cherimola leaves*. Journal of Ethnopharmacology.
- Pedro L. Falé, Carlos Borges, Paulo J. Amorim Madeira, Lia Ascensão, Maria Eduarda M. Araújo,Maria Helena Florêncio, Maria Luísa M. Serralheiro.(2009) *Rosmarinic acid, scutellarein 4-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of Plectranthus barbatus ('falso boldo')*. Food Chemistry.
- Pedro L. Falé, Catarina Ferreira, Ana M. Rodrigues, Pedro Cleto, Paulo J. Amorim Madeira, Maria H. Florêncio, Fátima N. Frazão and Maria L. M. Serralheiro.(2013). *Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion*. Journal of Medicinal Plants Research.
- Pedro L. Falé,, Catarina Ferreira, Ana M. Rodrigues, Fátima N. Frazão and Maria L. M. Serralheiro.(2013). *Studies on the molecular mechanism of cholesterol reduction by Fraxinus angustifolia, Peumus boldus,*
- Pedro Luis Vieira Falé^{a,1}, Ana Margarida Rodrigues^b, Letícia Silva^b, Paulo Madeira^a, Maria Helena Florêncio ^{a,c}, Lia Ascensão^b, Maria Luisa Marques Serralheiro^{a,c*}. (2014).*Phenolic compounds from Five Asteraceae Species from the Portuguese Aromatic flora with Anti-acetylcholinesterase, Antioxidant and Anti-proliferative Activities*.Chemistry & Biodiversity.

- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A. & Andrade, P. B. (2009). *Phenolics: From chemistry to biology. Molecules*, 14, 2202-2211.
- Petisca, C. I. B. (2008). *Quantificação dos Compostos Bioativos em Infusões de Chá Verde dos Açores: Comparação com os Teores Presentes em Bebidas Comerciais com Chá Verde*. Trabalho de Investigação da Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto.
- Pizziolo, V.R.; Brasileiro, B.G.; Oliveira, T.T.; Nagem, T.J. (2011). *Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008*; Revisão.
- Porfírio, S., Falé, P., Madeira, P. J. A., Florêncio, M. H., Ascensão, L. & Serralheiro, M. L. M. (2010). Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after *in vitro* gastrointestinal metabolism. *Food Chemistry*, 122, 179-187.
- Proença da Cunha A, Silva AP, Roque OR (2003). *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. (1st ed.). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. pp. 86-87.
- R. A. Yunes, V. Cechinel Filho, (2001). *Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental*. Chapecó-SC, Argus, 523 p.
- Ritter, M. R. & baptista, L. R. M. (2005). *Levantamento florístico da família Asteraceae na "Casa de Pedra" e áreas adjacentes, Bagé, Rio Grande do Sul. Iheringia: Série Botânica*, v.60, n.1, p.5-10,
- Ruiz A.L.T.G., Taffarello D., Souza V.H.S., Carvalho J.E. (2008). *Farmacologia e Toxicologia de Peumus boldus e Baccharis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2): 295-300.
- Sané, A.T., Sinnett, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V., Ménard, D., Beaulieu, J.-F., Levy, E., (2006). *Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine*. *Journal of Lipid Research* 47, 2112–2120.
- Serrano, J., Goñi, I., Calixto, F. S. (2007). *Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity*. *Food Research International*, 40, 15-21.
- Silman I; Sussman J (2005). *Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology*. *Curr Opin Pharmacol* 5:239-302.
- Silva, L. J. F. (2010). *Actividades biológicas e estruturas secretoras em Artemisia campestris Helichrysum stoechas (Asteraceae)*. Acedido em: <http://hdl.handle.net/10451/2777>.
- Singh, D.K., Banerjee, S., Porter, T.D., (2009). *Green and black tea extracts inhibit HMG-CoA reductase and activate AMP kinase to decrease cholesterol synthesis in hepatoma cells*. *Journal of Nutritional Biochemistry* 20, 816–822.
- Sousa, C.M.M., Silva H.R., Vieira-Jr. G.M., Ayres M.C.C., Costa C.L.S., Araújo D.S., Cavalcante L.C.D, Barros E.D.S., Araújo P.B.M., Brandão M.S., Chaves M.H. (2007). *Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais*. *Química Nova*, 30 (2), 351-355.
- Takjarimi, M. M., Ibrahim, S. A. & Cliver, D. O. (2010). *Antimicrobial herb and spice compounds in food*. *Food Control*, 21, 1199-1218.
- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M (2005). *Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae)*. *Food Chem.* 90: 333-340
- Tepe B, Sokmen M, Sokmen A, Daferera D, Polissiou M (2005a). *Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of Cyclotrichium origanifolium (Labill.) Manden. and*

- Valentão P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML (2002). *Antioxidative properties of cardoon (Cynara cardunculus L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid*. J. Agric. Food Chem. 14:4989-4993.
- Veiga Junior, V.F., Pinto A.C. (2005). *Plantas medicinais: cura segura?* Química Nova, 28(3):519-528.
- Verdi L.G, Brighente I.M.C, Pizzolatti M.G (2005). *Gênero Baccharis (Asteraceae): Aspéctos químicos, econômicos e biológicos*. Quím. Nova 28: 85-94.
- Viegas Junior, C., Bolzani, V.S., Furlan, M. (2004). *Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer*. Química Nova, 27(4): 655-660.
- Wong, S. P., Leong, L. P., Koh, J. H. W. (2006). *Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants*. Food Chemistry, 99: 775–783.
- Yamamoto, Y., Takahashi, Y., Kawano, M., Iizuka, M., Matsumoto, T., Saeki, S. u peter (1999). *In vitro digestibility and fermentability of levan and its hypocholesterolemic effects in rats*. Journal of Nutritional Biochemistry, 10: 13–18.